

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS
FACTORES DE PATOGENICIDAD DE CEPAS DE *Clavibacter michiganensis*
SUBSP. *michiganensis*, PRESENTES EN EL CINTURÓN VERDE DE BUENOS
AIRES-LA PLATA

*Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Eliana Wassermann

Lugar de trabajo: Facultad de Agronomía, Cátedras de Microbiología Agrícola y
Fitopatología



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

Ana María Romero

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Philosophy Doctor (North Carolina State University, EEUU)

Co-directora

Olga Susana Correa

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

Consejera de Estudios

Viviana Mónica Chiochio

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora de la Universidad de Buenos Aires (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Directora de tesis

Ana María Romero

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Philosophy Doctor (North Carolina State University, EEUU)

JURADO

Adriana M. Alippi

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de la Plata)

Doc. en Ciencias Agrícolas (Universidad Nacional de la Plata)

JURADO

Juan Carlos Díaz Ricci

Ingeniero Químico (Universidad Nacional de Tucumán)

Magister en Biología Molecular y Microbiología (Universidad Nacional de Rosario)

JURADO

María Rosa Simón

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de la Plata)

Philosophy Doctor Crop Ecology and Resource Conservation (Wageningen Universiteit en Researchcentrum)

Fecha de defensa de la tesis: 28 de marzo de 2017

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi familia, a mi hermano y mi sobrino, y muy especialmente a mis padres Alfredo O. Wassermann y Débora B. Serlik de Wassermann que me enseñaron la importancia y el valor de la educación y el conocimiento, y siempre me apoyaron en mi tan ramificado camino.

Agradecimientos

A mi directora, Ana M. Romero, que confió en mí para realizar este proyecto, me introdujo en el tema y me guió en este trayecto.

A mi codirectora, Olga S. Correa, que me acercó al proyecto y me ayudó en este trabajo con todos sus aportes.

A Marcela S. Montecchia, por sus aportes en el laboratorio y en las instancias de escritura.

A Romina Giacometti y Jimena Ruíz por compartir sus conocimientos y despejar mis dudas.

A Jorgelina Rolleri, Verónica G. Obregón, Ceferino R. Flores y Damián Vega por facilitarme el acceso a las cepas que utilicé en este trabajo.

A Valeria, por su ayuda en el trabajo con las plantas y toda su buena predisposición.

A los compañeros de la oficina por los momentos, los mates, las cosas ricas, las catarsis compartidas y todo el cariño.

Al resto de los que conforman el INBA y la Cátedra de Microbiología de la FAUBA por las discusiones y los consejos.

Y muy especialmente a Damián Vega por toda su paciencia y, especialmente, por todo su amor.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Eliana Wassermann

Índice general

Dedicatoria.....	III
Agradecimientos	V
Índice general.....	IX
Índice de cuadros	XI
Índice de figuras.....	XII
Abreviaturas.....	XV
Resumen.....	XIX
Abstract.....	XXI
A. PROBLEMA Y ANTECEDENTES	3
A.1 El tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	3
A.2 Cancro y marchitamiento bacteriano del tomate.....	3
A.3 El Patógeno, <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	7
A.4 Factores de patogenicidad	7
A.5 Estructura poblacional.....	9
Objetivo General y específicos	11
Hipótesis	11
B. MATERIALES Y MÉTODOS	16
B.1. Aislamiento, identificación y purificación de ADN genómico de las cepas de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	16
B.2. Caracterización de la estructura y diversidad genética de las poblaciones de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	17
B.3. Amplificación de las secuencias de los genes de patogenicidad presentes en la isla de patogenicidad	18
B.4. Amplificación de las secuencias de los genes de patogenicidad presentes en los plásmidos	18
B.5. Relación entre la agresividad de las distintas cepas y sus características genéticas.	21
C. RESULTADOS.....	26
C.1. Aislamiento e identificación de las cepas de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	26

C.2.	Caracterización de la estructura y diversidad genética de las poblaciones de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	31
C.3.	Genes de patogenicidad presentes en la isla de patogenicidad del cromosoma y en los plásmidos	41
C.4.	Determinación de la agresividad de las distintas cepas y su relación con sus características genéticas.	49
D.	Discusión.....	60
E.	Conclusiones	68
	Situación actual del cancro y marchitamiento bacteriano del tomate y su agente causal <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	68
	Hipótesis 1: Estructura y diversidad genética de las poblaciones de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	68
	Hipótesis 2: Genes de patogenicidad presentes en los plásmidos y la IP del cromosoma y su relación con la agresividad	69
	Relevancia de la investigación	70
	Continuación de la investigación	71
F.	Referencias	76

Índice de cuadros

Cuadro C.2.1 Origen de las cepas analizadas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , año de aislamiento y resultado de la agrupación por BOX-PCR.	38
Cuadro C.2.2 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 52 aislamientos de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> del cinturón verde Buenos Aires-La Plata, Corrientes, Mendoza y Tucumán a partir de la información obtenida con el cebador BOXA1R. ($\phi=0,04$, $P<0,16$)	40
Cuadro C.2.3 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 35 aislamientos de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> del cinturón verde Buenos Aires-La Plata a partir de la información obtenida con el cebador BOXA1R. ($\phi=0$, $P<1$).....	40
Cuadro C.2.4 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 24 aislamientos de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> de la finca A del cinturón verde Buenos Aires-La Plata a partir de la información obtenida con el cebador BOXA1R. ($\phi=0,099$, $P<0,1$).....	40
Cuadro C.3.1 Resultado de la amplificación de ADN genómico de los genes de la isla de patogenicidad y de las secuencias de replicación de los plásmidos pCM1 y pCM2 de las cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> utilizadas en este estudio	43
Cuadro C.3.2 Resultado de la amplificación a partir de ADN plasmídico de los genes de patogenicidad y de las secuencias de replicación de los plásmidos pCM1 y pCM2 de las cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> utilizadas en este estudio	47
Cuadro C.3.3 a) presencia/ausencia de la secuencia <i>repA-pCM1</i> y presencia/ausencia de la secuencia del gen <i>celA</i> , b) presencia/ausencia de la secuencia <i>repA-pCM2</i> y de la secuencia del gen <i>pat-1</i> de las cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> aisladas en Argentina utilizadas en este estudio, obtenidas a partir del ADN plasmídico.	48
Cuadro C.4.1: Análisis de la varianza de la caracterización de la agresividad de las cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> utilizadas en este trabajo en tres ensayos diferentes. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), primer día post inoculación en que se observaron síntomas (PDPI) y severidad de la decoloración vascular en tallo. El asterisco a la derecha del valor P señala que hubo diferencias significativas.....	50
Cuadro C.4.2: Análisis de la varianza de la caracterización de la agresividad de los grupos BOX de cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> utilizadas en este trabajo en tres ensayos diferentes. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), primer día post inoculación en que se observaron síntomas (PDPI) y severidad de la decoloración vascular en tallo. El asterisco a la derecha del valor P señala que hubo diferencias significativas.	53
Cuadro C.4.3: Análisis de la varianza de Kruskal Wallis de la caracterización de la agresividad de los ensayos realizados con cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), primer día post inoculación en que se observaron síntomas (PDPI) y severidad de la decoloración vascular en tallo.	56

Índice de figuras

- Figura A.1.1** Fotos representativas de síntomas y signo de cancro y marchitamiento bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a) necrosis foliar, b) marchitamiento c) cancro en el tallo d) zooglea en la axila del peciolo 6
- Figura C.1.1** Diagrama del origen de las cepas del cinturón verde Buenos Aires-La Plata utilizadas en este trabajo agrupadas por localidad, productor y año y cantidad de aislamientos obtenidos. 27
- Figura C.1.2** Diagrama de cepas utilizadas en este trabajo. Agrupadas según origen: provincias, semilla importada o colección nacional de bacterias fitopatógenas (NCPBPB) del Reino Unido y cantidad de aislamientos. 28
- Figura C.1.3** Foto representativa del a) crecimiento en medio YDC y b) observación al microscopio óptico (1.000x) de la tinción de Gram de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, y c) reacción de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa*..... 29
- Figura C.1.4** Fotos comparativas de diferentes fenotipos de las cepas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas. Repiques realizados en YDC e incubados según se explica en B. Materiales y métodos. Nótese la textura menos mucosa y más anaranjada de la cepa Cmm66 y el color más claro de la cepa Cmm33..... 30
- Figura C.1.5** Productos de amplificación de ADN genómico de diferentes cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* obtenidos con los cebadores PSA 4/R resueltos en gel de agarosa 1,2 %. Los números sobre la figura indican la numeración dada a cada cepa. La calle M corresponde al marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen). 30
- Figura C.2.1** Perfiles de 11 cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas del cinturón verde de Buenos Aires-La Plata, una aislada de semilla importada (Cmm97) y la cepa de referencia NCPBPB382. a) BOX-PCR b) ERIC-PCR c) REP-PCR. Los perfiles se analizaron con GelCompar como se explica en B. Materiales y métodos..... 32
- Figura C.2.2** Fotografías de la amplificación con BOX-PCR de 50 cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Las condiciones de amplificación se hicieron como se describe en B. Materiales y Métodos. Los números al costado de la foto muestran el tamaño de bandas correspondientes a los marcadores moleculares 1 kb plus (Invitrogen; M). Las barras superiores marcan grupos de BOX-PCR. Las flechas señalan las bandas polimórficas que resultaron clave para la separación de los grupos. 35
- Figura C.2.3** Perfil de BOX-PCR de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este trabajo. Las condiciones de amplificación y los análisis se hicieron como se describe en la sección B. Materiales y Métodos. Números en el eje horizontal superior indican el porcentaje de similitud. La columna en el lado derecho muestra la denominación de las cepas..... 37
- Figura C.3.1** Productos de amplificación de los genes a) *chpC* b) *chpG* c) *ppaA* y d) *tomA* a partir de ADN genómico y resueltos en gel de agarosa 1,5 %, según se describió en B. Materiales y Métodos. Los números sobre la figura indican la numeración dada a

cada cepa, la primera columna de la izquierda corresponde al marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen)..... 42

Figura C.3.2 Productos de amplificación del gen de replicación de los plásmidos a) pCM1y b) pCM2 y los genes de patogenicidad presentes en cada uno de ellos, c) *celA* y d) *pat-1* amplificados a partir del ADN de los plásmidos purificados como se explica en B. Materiales y Métodos en gel de agarosa 1,5 %. Números arriba de cada columna indican el número asignado a la cepa. Primera columna de la izquierda: Marcador molecular en a) 100 bp (Promega), en b), c) y d) 1 kb plus (Invitrogen)..... 46

Figura C.4.1 Caracterización de la agresividad de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este trabajo en tres ensayos diferentes. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), primer día post inoculación en que se observaron síntomas (PDPI) y severidad de la decoloración vascular en tallo. Las barras representan la media de cinco repeticiones; las barras de error representan el error estandar de la media. Rosa, grupo BOX I; celeste, grupo BOX II; verde, grupo BOX III y naranja: cepas de referencia obtenidas de la colección nacional de bacterias fitopatógenas del Reino Unido..... 52

Figura C.4.2 Caracterización de la agresividad promedio de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* según los grupos de BOX, en tres ensayos diferentes. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) primer día post inoculación (PDPI) en que se observaron síntomas y severidad de la decoloración vascular en tallo. Las barras representan la media de 5 repeticiones; las barras de error representan el error estandar de la media. 55

Figura C.4.3 Caracterización de la agresividad promedio de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* según el ensayo. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) primer día post inoculación (PDPI) en que se observaron síntomas y severidad de la decoloración vascular en tallo. Las barras representan la media de 35 repeticiones (siete cepas por cinco repeticiones); las barras de error representan el error estandar de la media. 56

Abreviaturas

- ABCPE: área bajo la curva de progreso de la enfermedad
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AFLP: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (*amplified fragment length polymorphism*)
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- ARNr: ácido ribonucleico ribosomal
- chp*: homólogo cromosómico del gen *pat-1* (*chromosomal homology to pat-1*).
- Cmm*: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
- CVBALP: Cinturón verde Buenos Aires-La Plata
- EEA: Estación experimental agropecuaria
- EE.UU.: Estados Unidos
- GFP: Proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)
- IMS: separación inmunomagnética (*immunomagnetic separation*)
- INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- IP: Isla de patogenicidad.
- ISSR-PCR: Amplificación de secuencias simples repetidas en tándem. (*Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction*)
- MLSA: Análisis de secuencias de locus múltiples (*Multi locus sequence analysis*)
- MLST: Tipificación de secuencia de locus múltiples (*Multi-locus sequence typing*)
- NADPH: Nicotidamina adenina dinucleótido
- NCPBP: Colección nacional de bacterias fitopatógenas del Reino Unido (*National Collection of Pathogenic Phytobacteria*)
- NEA: Noreste Argentino
- NOA: Noroeste Argentino
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PDPI: primer día post inoculación
- PFGE: Electroforesis de campo pulsante en gel (*Pulsed field gel electrophoresis*)
- RAPD: Amplificación al azar o aleatoria de ADN polimórfico (*Random amplified polymorphic DNA*)
- rep-PCR: Amplificación por PCR de elementos palindrómicos repetitivos (*repetitive element palindromic PCR*)
- RFLP: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

XVI

TBE: Buffer Tris-Ácido Bórico-EDTA

TE: Buffer Tris-EDTA

UFC: unidades formadoras de colonia

YDC: Medio levadura, dextrosa y carbonato (*yeast dextrose carbonate*).

UPGMA: Método de agrupamiento de pares no ponderados usando la media aritmética (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*)

YPGA: Medio levadura, papa, glucosa, agar (*Yeast Potato Glucose Agar*).

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS
FACTORES DE PATOGENICIDAD DE CEPAS DE *Clavibacter michiganensis*
SUBSP. *michiganensis* PRESENTES EN EL CINTURÓN VERDE DE BUENOS
AIRES-LA PLATA

Resumen

El cancro y marchitamiento bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, es considerada una de las enfermedades bacterianas más graves del tomate. En Buenos Aires puede alcanzar 100 % de incidencia al final del cultivo. El objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente y según su agresividad poblaciones de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* del cinturón verde de Buenos Aires-La Plata. Se analizaron en total 56 aislamientos procedentes de plantas enfermas, de semillas importadas, y dos cepas de referencia, NCPPB382 y NCPPB399. Los aislamientos se caracterizaron por BOX-PCR, la presencia de los plásmidos y los genes de patogenicidad presentes en los mismos y en la isla de patogenicidad del cromosoma, identificados en la cepa NCPPB382. Estos datos se relacionaron con la agresividad de las cepas. Los aislamientos locales y de semilla se distribuyeron en tres grupos de BOX-PCR con un 88 % de similitud. Ninguna de las cepas locales se agrupó con NCPPB382. No se encontró relación entre los grupos genéticos y la finca, localidad o año de aislamiento de las cepas, lo que sugiere que las fuentes de inóculo fueron diversas. En ocasiones, cepas obtenidas en diferentes años de un mismo invernadero correspondieron a un mismo grupo genético. La agresividad de las cepas fue muy variable dentro de cada grupo de BOX-PCR, y no hubo diferencias entre grupos. Pese a esto, todos los aislamientos amplificaron todos los productos esperados para los genes de patogenicidad. Mientras que el pCM2 parece estar muy conservado en las cepas locales, el pCM1 estaría asociado con el grupo genético III. Los datos presentados sugieren que cepas introducidas en las semillas pueden estar conviviendo con otras que sobreviven localmente. Los genes de patogenicidad analizados están muy conservados; aquellos presentes en los plásmidos de NCPPB382 pueden encontrarse en otros plásmidos o en el cromosoma.

Palabras clave:

agresividad, cancro y marchitamiento bacteriano del tomate, *Solanum lycopersicum* L., rep-PCR, inóculo primario, plásmido, genes de patogenicidad, BOXA1R

POPULATION STRUCTURE AND GENETIC CHARACTERIZATION OF
PATHOGENICITY FACTORS OF *Clavibacter michiganensis* SUBSP.
michiganensis STRAINS FROM BUENOS AIRES-LA PLATA GREEN BELT

Abstract

Bacterial wilt and canker, caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, is considered one of the most important diseases of tomato worldwide. In Buenos Aires it can reach up to 100 % incidence at the end of the crop season. The objective of this work was to characterize genetically and by their aggressiveness some *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from the Buenos Aires-La Plata green belt. We analyzed a total of 56 strains isolated from diseased plants, imported seeds and two reference strains, NCPPB382 and NCPPB399. The isolates were characterized by BOX-PCR, the presence of plasmids, their pathogenicity genes and the ones described in NCPPB382's chromosomal pathogenicity island. The aggressiveness of the strains was evaluated and related to their genetic characteristics. Local and seed isolates were distributed in three BOX-PCR groups with 88 % similarity. None of the local strains grouped with NCPPB382. Genetic groups were not related to the greenhouse, location or year of isolation. This suggests that there are several sources of inoculum. However, in a few cases, identical bacterial fingerprints were isolated from the same greenhouse in different years. Although aggressiveness was very variable among strains from the same genetic group, all strains amplified the expected size products of the pathogenicity genes. While pCM2 seems to be widely distributed among local strains, pCM1 seems to be associated to genetic group III. Our results suggest that new strains introduced every year by imported seed might coexist with others persisting locally. The analyzed pathogenicity genes are conserved; those present in NCPPB382 plasmids could be present in other plasmids or even in the chromosome.

Key words

aggressiveness, Bacterial Wilt and Canker of tomato, *Solanum lycopersicum* L., rep-PCR, primary inoculum, plasmids, pathogenicity genes, BOXA1R

A

Problemas y Antecedentes

A. PROBLEMA Y ANTECEDENTES

A.1 El tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

El tomate es uno de los cultivos hortícolas de consumo fresco de mayor superficie y volumen de producción en todo el mundo, incluida la Argentina (FAO, 2016). Su producción mundial en el 2013 alcanzó las 163.434.000 t. A nivel nacional la producción fue de más de 691.383 t en el 2013, siendo la superficie cultivada de 12.000 ha en campo y 3.000 ha bajo cubierta (FAO, 2016). En ambos casos el rendimiento promedio fue de 35 a 40 t ha⁻¹ (Nakama y Fernández Lozano, 2006). La principal zona productora de tomate destinada a conserva es Cuyo con 310.000 t; para consumo fresco se destacan el NOA con 260.000 t, La Plata con 100.000 t y el NEA con 70.000 t (Nakama y Fernández Lozano, 2006; Pollack, 2012). En los alrededores de Buenos Aires-La Plata representa el principal cultivo.

En la Argentina la mayoría de los productores compra los plantines listos para ser trasplantados en bandejas producidas en viveros (plantineras), los cuales, usualmente, son híbridos de semilla importada. Los cultivos comerciales en gran medida también se cultivan en invernadero, especialmente en la zona del cinturón verde de Buenos Aires-La Plata (CVBALP), Corrientes y Jujuy. En la provincia de Buenos Aires el 34 % de la superficie cultivada bajo cubierta se dedica a tomate (Corvo Dolcet, 2005). Las plantas, por lo general, se conducen a un tallo atándolas a la estructura del invernadero. Periódicamente se podan los brotes nuevos y las hojas viejas se eliminan. Al realizar los cortes, las cuchillas o tijeras entran en contacto con el sistema vascular de las plantas representando un riesgo de transmisión de enfermedades, particularmente las sistémicas o vasculares.

Debido a la demanda creciente, el tomate tiene un gran potencial para un aumento en su comercialización. Un mayor conocimiento de los patógenos que afectan al cultivo y los métodos de manejo, permitirá una producción más eficiente (Pastor *et al.*, 2012).

A.2 Cancro y marchitamiento bacteriano del tomate

El Cancro y Marchitamiento Bacteriano del Tomate, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), es considerada la enfermedad bacteriana más grave del tomate en el mundo (Sen *et al.*, 2015). Fue descrita por primera vez en Michigan, Estados Unidos, por Erwin F. Smith en 1910; actualmente está presente en las principales regiones productoras de tomate del mundo (de León *et al.*, 2011). En algunos países o regiones está incluida en la categoría A2 de la lista de enfermedades cuarentenarias, como por ejemplo en las de la Organización Europea de Protección de las Plantas (EPPO), en la Comisión de Protección de las Plantas de Asia y el Pacífico (APPPC), en la Comisión de Protección de las Plantas del Caribe (CPPC) y el Consejo Fitosanitario Interafricano (IAPSC). Esta categorización significa que la enfermedad está presente con una distribución limitada en la región, debiéndose mantener bajo control fitosanitario oficial para evitar su diseminación (Janse, 2005; EPPO, 2015). Pese a estas medidas en los últimos años ha habido un resurgimiento del cancro bacteriano en diversos países como por ejemplo en Bélgica,

EE. UU., Israel, Japón, México y en las Islas Canarias, España (Kleitman *et al.*, 2008; Borboa Flores *et al.*, 2009; de León *et al.*, 2009; Quesada-Ocampo *et al.*, 2012; Zaluga *et al.*, 2013).

Esta enfermedad puede causar grandes pérdidas económicas. En Ontario, Canadá, se informaron pérdidas del 84% en cultivos comerciales (Poysa, 1993), y en Queensland, Australia, la muerte de plantas determinó que el rendimiento se redujera 10 veces (Dullahide *et al.*, 1983).

En Argentina, el cancro bacteriano fue mencionado por primera vez en 1957 (Fernandez Valiela, 1975); desde entonces fue citado en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Corrientes, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Misiones, Río Negro, Salta y Santa Fe (Dal Bó *et al.*, 2014). La enfermedad causa serios daños en cultivos bajo cubierta, particularmente en el CVBALP. En observaciones realizadas recientemente en esta zona la incidencia en planta al finalizar el cultivo llegó en algunos casos hasta el 100 % (Rolleri, 2015), causando grandes pérdidas económicas y agrícolas.

El patógeno puede causar infecciones sistémicas, al colonizar el tejido vascular, o localizadas, cuando solo se multiplica en tejidos superficiales de la planta. Cuando la infección es sistémica, la enfermedad se puede reconocer en etapas tempranas por presentar áreas de color verde pálido con aspecto oleoso entre las nervaduras de las hojas, las cuales rápidamente se necrosan y toman un color marrón claro. Con frecuencia estas lesiones son marginales, dándole a la planta un aspecto quemado (Gleason *et al.*, 1993; Jahr *et al.*, 2000; Yim *et al.*, 2011; OEPP/EPPO, 2013). En otras ocasiones, lo primero que se observa es que las hojas se tornan flácidas, a veces de un solo lado del raquis, mientras que del otro lado se mantienen turgentes. Al avanzar la enfermedad todas las hojas se marchitan, debido a la reducción en la conductividad hidráulica de los tallos (Vega y Romero, 2016), y la planta muere. El tejido vascular de las plantas infectadas puede aparecer de color marrón claro al principio y oscurecerse en la medida que avanza la infección. A veces, se observan manchas o estrías marrones o plateadas en los tallos y/o pecíolos, las cuales pueden transformarse en cancos (figura A.1.1).

En las infecciones localizadas se observan manchas en hojas, pecíolos, pedúnculos y/o frutos (Chaldecott y Preece, 1983; Gleason *et al.*, 1993). Generalmente este tipo de infección es más frecuente en tomate de campo que en invernadero, por estar relacionada con la dispersión secundaria del patógeno por lluvia o riego por aspersión. Los síntomas en los frutos pueden comenzar como pequeñas puntuaciones apenas elevadas, que luego se expanden unos pocos milímetros permaneciendo el centro marrón y áspero, rodeadas de un margen o halo blanco. Esas lesiones se conocen como “ojo de pájaro” (Chang *et al.*, 1992a; b; Gleason *et al.*, 1993; Medina-Mora *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2002; Gartemann *et al.*, 2003; Nazari *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2013). Estas lesiones pueden no producir pérdidas del rendimiento, pero reducen la calidad de los frutos para su venta fresca (Chang *et al.*, 1992a; Gleason *et al.*, 1993).

Las plantas infectadas sistémicamente pueden alcanzar un menor tamaño, no fructificar e incluso morir. La consecuencia económica se refleja en la merma de la

producción de tomate y de su calidad para el mercado de hortalizas frescas, secas o enlatadas.

Los síntomas en las plantas y las consecuencias económicas en el cultivo pueden variar según la agresividad de la cepa, las condiciones ambientales, la susceptibilidad del híbrido o variedad, el estado ontogénico del cultivo, la concentración del inóculo y el lugar en el que se produce la infección. En plantines de dos a cuatro semanas de edad, cuando la infección ocurre directamente en el sistema vascular son suficientes menos de 10 células bacterianas para producir la enfermedad (Kaneshiro, 2003), mientras que la inoculación en otro lugar puede requerir más de 10^6 células/planta (Strider, 1970). Independientemente del lugar de inoculación, una baja concentración de inóculo retrasa la aparición de síntomas (Chang *et al.*, 1992b).

Cuando la infección ocurre en plantines de más de cinco semanas, el período de incubación de la enfermedad se incrementa y la severidad disminuye (Chang *et al.*, 1992b; Sharabani *et al.*, 2013). Y si la infección se atrasa hasta que las plantas tienen más de 19 hojas, manifiestan pocos síntomas sin consecuencias negativas en el rendimiento (Sharabani *et al.*, 2013). Por el contrario, si las plantas son más pequeñas en el momento de la infección no solo se reducen los rendimientos sino que las plantas pueden morir (Sharabani *et al.*, 2013).

Las bajas temperaturas también producen un aumento en el período de incubación y un posterior retraso en la manifestación de la enfermedad. La temperatura del aire y del suelo óptima para el desarrollo de la enfermedad es de 24 °C – 28 °C. Temperaturas por debajo de 15 °C reducen el crecimiento de los plantines y retardan la aparición de los síntomas, resultando en plantas menos vigorosas y con menos hojas y que presentan canchros en vez de marchitamiento (Chang *et al.*, 1992b). Las bajas temperaturas los primeros días después de la infección parecen tener mayor influencia en el menor desarrollo de la infección que en etapas posteriores (Sharabani *et al.*, 2014).

a)



c)



b)



d)



Figura A.1.1 Fotos representativas de síntomas y signo de cancro y marchitamiento bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a) necrosis foliar, b) marchitamiento c) cancro en el tallo d) zoogonea en la axila del peciolo

A.3 El Patógeno, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

El género *Clavibacter* pertenece al orden *Actinomycetales* y a la familia *Microbacteriaceae*. *Clavibacter michiganensis*, la única especie del género, contiene 5 subespecies patógenas de cultivos de importancia económica. Las subespecies se diferencian con cebadores específicos que amplifican secuencias diferentes de la sección intergénica entre los genes 16s y 23s del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), (Patrik y Rainey, 1999); por características bioquímicas, como utilización de acetatos, producción de azúcares reducidos y producción de polímeros de fructuosa (Eichenlaub *et al.*, 2006); y por el hospedante al que afectan: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* es el agente causal del cancro y marchitamiento bacteriano del tomate, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* infecta cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* es causante de marchitez y retardo en el crecimiento en alfalfa (*Medicago sativa*), *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* produce marchitamiento y muerte del maíz (*Zea mays*), y por último, *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* induce el mosaico bacteriano en trigo (*Triticum aestivum*) (Eichenlaub y Gartemann, 2011). Recientemente, se describió otra subespecie patógena, *C. michiganensis* subsp. *phaseoli* en poroto (González y Trapiello, 2014) y dos no patógenas, *C. michiganensis* subsp. *chilensis* y *C. michiganensis* subsp. *californiensis* aisladas de semillas de tomate (Yasuhara-Bell y Alvarez, 2015). Las subespecies de *C. michiganensis* constituyen un grupo de bacterias Gram + con un contenido G + C de 70 % \pm 5, y no son móviles.

C. michiganensis subsp. *michiganensis* puede infectar a varias especies de la familia de las solanáceas, pero solo tiene importancia económica en el tomate y, en mucha menor medida, en pimiento (*Capsicum annuum* L.) (Lewis Ivey y Miller, 2000), aunque este último hospedante no ha sido mencionado aún en la Argentina. Se trata de una bacteria aerobia, mesófila, con una temperatura óptima de crecimiento a 25 °C a 28 °C y un máximo a 35 °C. En medio YDC (*Yeast Dextrose Calcium Carbonate*) forma colonias de color amarillo anaranjado como resultado de la producción de carotenoides, y con aspecto mucoso a causa de la producción de exopolisacáridos. Al microscopio, generalmente se observan bastones pleomórficos no agrupados o de a pares en forma de V, aunque también se pueden ver agregados de células. No forma endosporas, ni tiene crecimiento hifal. El pH óptimo se encuentra entre 7 y 8, pero hay crecimiento incluso a pH 5, lo cual es importante cuando la bacteria invade los vasos xilemáticos (Eichenlaub *et al.*, 2006).

A.4 Factores de patogenicidad

Aún se conoce poco sobre cuáles son los mecanismos de infección y colonización de la planta hospedante por parte de fitopatógenos Gram +, como *Cmm* (Eichenlaub y Gartemann, 2011). Estas bacterias no poseen el sistema excretor tipo III (*Hrp*) ampliamente conocido y estudiado en las bacterias Gram - (Eichenlaub y Gartemann, 2011). Hay evidencias de que *Cmm* ingresa a la planta a través de aberturas naturales, hidatodos, estomas, tricomas rotos y otras heridas, llega al xilema y genera una infección sistémica masiva (Eichenlaub *et al.*, 2006). Los estudios sobre el crecimiento endofítico de la bacteria se vieron facilitados por el uso de cepas bioluminescentes o marcadas con una proteína verde fluorescente (GFT) (Xu *et al.*,

2010; Chalupowicz *et al.*, 2012). De todas maneras, los mecanismos empleados por el patógeno durante el proceso de infección aún no están desentrañados (Eichenlaub *et al.*, 2006).

Para conocer más sobre los procesos de infección y colonización de *Cmm* se han realizado estudios genéticos. La mayoría de estos estudios, incluida la secuenciación completa del genoma, se hicieron con la cepa NCPPB382, aislada en el año 1956 en el Reino Unido (Eichenlaub y Gartemann, 2011). En ella se encontraron una isla de patogenicidad (IP) en el cromosoma y dos plásmidos, pCM1 (27 kb) y pCM2 (70 kb), los cuales portan los que son considerados los principales genes de patogenicidad de la bacteria.

En pCM1 se localiza el gen de una endo β -1,4 glucanasa denominada *celA* y en pCM2 la secuencia *pat-1* que codifica para una proteína homóloga a la serin-proteasa de *Lysobacter enzymogenes* y *Streptomyces griseus* (Jahr *et al.*, 1999), cuya función es la digestión de oligopéptidos (Meletzus *et al.*, 1993). Cepas sin alguno de estos plásmidos mostraron menor agresividad que aquellas que tenían ambos plásmidos. La ausencia de ambos plásmidos determinó la pérdida de la virulencia, aunque no se vio afectada la capacidad de colonizar al hospedante (Jahr *et al.*, 1999).

La IP descrita en la cepa NCPPB382 se diferencia del resto del cromosoma por contener cerca de un 10 % menos de G+C (Gartemann *et al.*, 2008). En esta IP se han reconocido genes de importancia para la colonización del hospedante, la evasión y la supresión de las reacciones de defensa de la planta, organizados en dos subregiones denominadas *chp* y *tomA*. Las cepas que no amplifican algunos de los genes presentes en estas subregiones no son virulentas o su agresividad se ve reducida (Kleitman *et al.*, 2008), lo que confirma la relación de la IP con la patogenicidad de la bacteria. La subregión *tomA* tiene un gen que codifica una tomatinasa que deglucosida la saponina antifúngica/antibacteriana α -tomatina producida por las plantas de tomate. También contiene numerosos genes que codifican otras glicosidasas, transportadores de azúcares y reguladores que pueden estar involucrados en la degradación de oligosacáridos derivados de la planta (Eichenlaub y Gartemann, 2011). En la subregión *chp* (*chromosomal homology to pat-1*) se encontraron genes homólogos a los que codifican la proteína *pat-1* del plásmido pCM2, que se designaron *chpA-G* (Burger *et al.*, 2005). En la subregión *chp* también se encuentra la familia Ppa de serin-proteasas relacionadas con la quimotripsina, dentro de la cual se encuentra la secuencia *ppaA*. Esta familia, junto con *chpC*, estaría relacionada con la colonización del hospedante y su inactivación llevaría a una disminución en la concentración del patógeno en la planta, y por lo tanto, a una menor agresividad de la cepa (Eichenlaub y Gartemann, 2011). Por otra parte, la inactivación de *chpG* no afecta la agresividad en tomate, pero elimina la reacción de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa* (Gartemann *et al.*, 2008).

Al menos tres son los mecanismos propuestos para explicar el marchitamiento causado por *Cmm*: el estrés hídrico causado por altas concentraciones de la bacteria en el sistema vascular y su consecuente taponamiento, la acción tóxica de los exopolisacáridos (EPS) bacterianos y el ataque enzimático al tejido de la planta (Berpohl *et al.*, 1996). Este último mecanismo está mediado en gran medida por la endo β -1,4 glucanasa, *celA*. El rol de los EPS en la obstrucción de los vasos

xilemáticos no ha sido demostrado, ya que bacterias que los producen en muy poca cantidad no son menos agresivas que las que producen cantidades mayores (Bermppohl *et al.*, 1996; Jahr *et al.*, 1999). No se han descrito sustancias tóxicas que produzca la bacteria.

Hay muy pocos estudios realizados sobre poblaciones naturales del patógeno buscando polimorfismos en los genes de patogenicidad en la IP y los plásmidos. Se han analizado poblaciones naturales del patógeno en Israel, Serbia y Estados Unidos y se observó la presencia de plásmidos distintos a los dos ya descritos, los cuales aún no han sido estudiados y por lo tanto se ignora su relación con la patogenicidad de *Cmm* (Kleitman *et al.*, 2008; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2015). Estos plásmidos varían en tamaño con respecto a los pCM1 y pCM2 e incluso se observaron plásmidos de diferentes tamaños portando *celA*. En Israel se detectaron secuencias correspondientes al gen *pat-1* en cepas en las que no se observó el plásmido pCM2, lo que permite suponer que ese gen o uno de sus homólogos pueden estar presentes en otros plásmidos o en el cromosoma. A pesar de que cepas mutantes de NCPPB382 sin alguno o ninguno de los dos plásmidos descritos son menos agresivas o pierden totalmente su agresividad, se conoce el caso de cepas de *Cmm* que a pesar de no tener plásmidos son patógenas (Meletzus *et al.*, 1993). En estos casos, se cree que la información para la traducción de estas proteínas se encuentra en el genoma.

A.5 Estructura poblacional

Se tiene poca información sobre la estructura poblacional de *Cmm* en áreas de Latinoamérica donde las epidemias son comunes y el tomate es el principal cultivo, como es el caso del CVBALP. Este tipo de análisis es fundamental para determinar el posible ingreso y persistencia del patógeno en un lugar determinado.

En estudios realizados en Japón e Israel se determinó que las cepas se agrupaban según localidad sin variar entre años, aún en regiones cercanas, indicando la persistencia local de distintos genotipos del patógeno (Kleitman *et al.*, 2008; Kawaguchi *et al.*, 2010). Por su parte, en las Islas Canarias se propuso que la bacteria se introdujo desde un único origen, persistiendo luego en rastros en los años siguientes (de León *et al.*, 2009). Para realizar éstos y otros estudios epidemiológicos, tales como el seguimiento de cepas, descubrimiento de fuentes de contaminación, así como el monitoreo de la dispersión de bacterias fitopatógenas, existen distintas técnicas que permiten generar y comparar perfiles genéticos. Entre las que se han utilizado para estudiar poblaciones de *Cmm* se encuentran: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), ISSR-PCR (*Inter simple sequence repeat-PCR*) y rep-PCR (*repetitive element palindromic-PCR*). El análisis de RFLP no permitió visualizar diferencias entre cepas aisladas en las Islas Canarias, pero la utilización de AFLP puso en evidencia que estas cepas eran diferentes a las de otro ayuntamiento del mismo país (*i.e.* Badajoz) y de otros países (*i.e.* Chile, Portugal y Los Países Bajos) (de León *et al.*, 2009). Lo mismo se vio con RAPD, aunque esta técnica es de difícil reproductibilidad ya que factores tales como residuos de etanol, temperatura de

hibridización y concentración del templado pueden alterar los resultados (Micheli *et al.*, 1994; Mueller y Wolfenbarger, 1999). La técnica de PFGE permite comparar más del 80 % del ADN total, lo que le da un gran poder discriminativo (Kaufmann, 1998). Con este procedimiento se pudo determinar una gran diversidad genética en las cepas de *Cmm* de Israel y Serbia (Kleitman *et al.*, 2008; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012). Esta técnica, aunque aún es ampliamente utilizada por su reproductibilidad, resulta extremadamente laboriosa (Lindstedt, 2005). La técnica de ISSR-PCR consiste en la amplificación de conjuntos de secuencias cortas repetidas dispersas en el genoma, que varían en número y extensión (Reddy *et al.*, 2002). Los estudios realizados en Turquía con la misma sugieren variabilidad genética entre distritos regionales (Baysal *et al.*, 2011). Sin embargo, Lindstedt (2005) sostiene que la generación de variaciones en el número de secuencias repetidas en tándem (*variable number of tandem repeat*) hace posible que dos clones idénticos puedan aparecer como cepas diferentes. Actualmente se han desarrollado técnicas que incluyen la secuenciación genética como parte de su protocolo. MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) se basa en la amplificación y posterior secuenciación de genes cuya función es básica para el mantenimiento de la vida celular, genes conocidos como *housekeeping*. La secuencia de los mismos se compara generando dendogramas que permiten visualizar la distancia genética entre los aislamientos (Maiden, 2006). En Francia (Jacques *et al.*, 2012) y en Serbia (Milijašević-Marčić *et al.*, 2012) pudieron agrupar las cepas en siete grupos, cada uno en su respectivo país. En Uruguay, con esta técnica, se encontraron 10 tipos de secuencias diferentes (Croce *et al.*, 2016). En el caso de Serbia, los resultados concordaron con los obtenidos utilizando PFGE (Milijašević-Marčić *et al.*, 2012). Sin embargo, esta técnica resulta onerosa por los costos que implica la secuenciación.

La técnica conocida como rep-PCR, tiene la ventaja de ser de fácil aplicación y muy robusta; está entre las técnicas más utilizadas para generar perfiles genéticos con *Cmm* (Louws *et al.*, 1998; Nazari *et al.*, 2007; Kleitman *et al.*, 2008; de León *et al.*, 2009; Kawaguchi *et al.*, 2010; Quesada-Ocampo *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2015; Ialacci *et al.*, 2015), y podría ayudar a inferir el posible origen del patógeno en nuevas epidemias y su posible persistencia en un lugar y/o diseminación entre las distintas zonas de producción del cultivo. Esta técnica está basada en la amplificación por PCR de secuencias distribuidas en el genoma bacteriano. Dichas secuencias se han llamado elementos BOX, ERIC y REP. Su amplificación genera un conjunto de fragmentos de ADN de tamaños diferentes, los cuales separados por electroforesis en geles de agarosa generan perfiles únicos que permiten detectar diferencias entre aislamientos de una misma subespecie (Louws *et al.*, 1998; de León *et al.*, 2009). Las variaciones que se observan en los perfiles pueden deberse a varios mecanismos, incluyendo supresión o inversión de bases. No se conoce la función precisa de las secuencias amplificadas, pero se ha postulado que son importantes para la organización del cromosoma, la expresión genética, la estabilidad de los ARNm o la interacción ADN-proteína (De Bruijn, 1992). Más allá de cuál sea su función, las secuencias repetidas, parecen estar ubicadas en posiciones características del genoma microbiano y han resultado ser eficientes para la caracterización de la estructura del ADN vía la generación de códigos genómicos similares a un código de barras llamados *fingerprints* (Louws *et al.*, 1997). El protocolo de rep-PCR es de aplicación

fácil, rápida y económica. En lo que respecta a *Cmm*, el cebador BOX A1R tiene gran sensibilidad para la caracterización genética de las distintas cepas, siendo más sensible y capaz de diferenciarlas que los AFLP (de León *et al.*, 2009). Varios investigadores de diversos países (Nazari *et al.*, 2007; Kleitman *et al.*, 2008; de León *et al.*, 2009; Kawaguchi *et al.*, 2010; Quesada-Ocampo *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2015; Ialacci *et al.*, 2015) pudieron obtener distintas conclusiones respecto al origen y persistencia del patógeno con esta técnica.

Pese a la importancia económica que tiene el tomate y los graves daños que ocasiona *Cmm*, la información sobre este patógeno es escasa, particularmente sobre cepas de Latinoamérica, mientras que a nivel mundial también se sabe poco sobre sus factores de patogenicidad. Un mayor conocimiento sobre la estructura y diversidad genética de las poblaciones de este patógeno en la Argentina aportará evidencias sobre las principales fuentes de inóculo primario, y la posible relevancia del ingreso al país de nuevos genotipos del patógeno junto con las semillas. Este saber permitirá tomar medidas para reducir las pérdidas agronómicas y económicas que ocasiona esta enfermedad. Por otro lado, resulta de importancia avanzar en el conocimiento sobre los genes relacionados con la virulencia y colonización del hospedante para dilucidar los mecanismos que tiene la bacteria para producir la enfermedad.

Objetivo General y específicos

El objetivo de este trabajo fue avanzar en el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* del cinturón verde de Buenos Aires-La Plata, sus factores de patogenicidad y su relación con la agresividad.

Los objetivos específicos fueron:

- Obtener una colección de aislamientos de *Cmm* de plantas de tomate con Cancro y Marchitamiento Bacteriano procedentes de invernaderos del cinturón verde Buenos Aires-La Plata.
- Caracterizar la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *Cmm* aisladas en distintos años e invernaderos.
- Establecer la presencia de los plásmidos pCM1 y pCM2 y sus factores de patogenicidad en las poblaciones del patógeno.
- Determinar, en la población de estudio, los genes de patogenicidad correspondientes a la isla de patogenicidad que se encuentran en el cromosoma.
- Establecer la relación entre la agresividad de las distintas cepas y sus características genéticas.

Hipótesis

- La estructura poblacional y la diversidad genética de *Cmm* está determinada por el origen de las cepas, ya sea a través de su introducción en semillas importadas infectadas/infestadas o su persistencia local. La presencia de un mismo genotipo en un invernadero a lo largo de los años estaría relacionada con una persistencia local del patógeno. Por el contrario, la detección de distintos genotipos en un lugar a lo largo de los años, sugiere una introducción con la semilla.
- La agresividad de las cepas locales de *Cmm* está determinada por los plásmidos portadores de genes de patogenicidad y por el tipo de esos genes presentes en la

isla de patogenicidad. La ausencia de alguno de los plásmidos o la falta de detección de algunos de los genes presentes en la isla de patogenicidad en NCPPB382 determina una menor agresividad.

B

Materiales y Métodos

B. MATERIALES Y MÉTODOS

B.1. Aislamiento, identificación y purificación de ADN genómico de las cepas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Se hicieron relevamientos en invernaderos de Arana, Berazategui, Colonia Urquiza, Florencio Varela y Olmos ubicados en el CVBALP, con el fin de obtener muestras para hacer aislamientos del patógeno. Además, con el objeto de comparar esos aislamientos con los de otras zonas del país, se obtuvieron muestras de plantas enfermas de Mendoza, de las que se hicieron aislamientos, y cepas de Corrientes y de Tucumán. Todos ellos se sumaron a los ya existentes en la colección del grupo de trabajo. Las cepas de Corrientes fueron una contribución de la Ing. Agr. Verónica G. Obregón de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Bella Vista del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y las de Tucumán, del Ing. Agr. Ceferino R. Flores de la EEA Yuto del INTA. Como controles se incluyeron dos cepas de referencia importadas de la colección nacional de bacterias fitopatógenas del Reino Unido (NCPBP, *National Collection of Pathogenic Phytobacteria*), la NCPBP382 y la NCPBP399. En total se analizaron 56 cepas.

Para hacer los aislamientos a partir de plantas sintomáticas, se cortaron secciones del tallo y con un bisturí estéril se eliminó la epidermis. Luego se molieron secciones de ~ 1 cm en un mortero estéril con 1 ml de agua destilada estéril y se estrió en medio YDC (extracto de levadura 10 g, D-glucosa 20 g, carbonato de calcio 20 g, y agar 15 g, en 1 L de agua destilada). En algunos casos, luego de retirar la epidermis se apoyó la zona del tallo cortada en el medio de cultivo, como un sello (Gitaitis *et al.*, 1991).

Se repicaron las colonias identificadas por sus características morfológicas al menos tres veces en medio YDC para purificarlas. Se les realizó la tinción de Gram, y se observó coloración, forma y disposición de las células. También se realizó la reacción de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa* (L.) infiltrando las hojas con una suspensión de *Cmm* ($\sim 10^8$ UFC/ml) utilizando una jeringa tipo tuberculina. Se realizaron tres repeticiones en plantas mantenidas con luz natural en el laboratorio. Como controles negativos se usaron plantas infiltradas con agua y con una suspensión de *Xanthomonas vesicatoria*, y como control positivo una suspensión de NCPBP382. La reacción de hipersensibilidad se observó en el tejido vegetal luego de 48 h de la infiltración (Gleason *et al.*, 1993).

Para verificar la identidad de las cepas se hizo una primera extracción de ADN calentando un tubo eppendorf que contenía una colonia bacteriana suspendida en 100 µl de agua milliQ estéril, en un baño de agua a 95 °C, y luego enfriando por 5 min en hielo. Luego, se realizó una amplificación utilizando los cebadores PSA-4 y PSA-R, correspondientes a la región intergénica entre 16S-23S del RNAr, específico de la subespecie (Patrik y Rainey, 1999; OEPP/EPPO, 2013) (Cuadro B.4.1). La amplificación se realizó con GoTaq® DNA Polymerase (Promega) según el protocolo del fabricante, con 20 pmol de cada cebador y 5 µl de muestra. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C/2,5 min, seguido de 25 ciclos de: 94 °C/30 s, hibridación a 63 °C/20 s, y una extensión de 72 °C/45 s; la extensión final se realizó a 72 °C por 5 min. Los productos de reacción se

separaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,2 % en buffer TBE a 90 V por 1,5 h. Los geles se tiñeron con SybrSafe (Invitrogen).

Una vez corroborada la identidad de las cepas éstas se guardaron en caldo nutritivo con 20 % de glicerol a -40 °C y -80 °C para utilizarlas a mediano y largo plazo. También se guardaron muestras en agua Glaciar® estéril a temperatura ambiente para utilizarlas a corto plazo. Para los ensayos de agresividad se utilizaron las muestras conservadas en el freezer para evitar posibles pérdidas de agresividad.

Finalmente, se realizó una extracción de ADN con el kit de purificación de Promega (*Wizard Genomic DNA Purification Kit*), según el protocolo del fabricante.

B.2. Caracterización de la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Las amplificaciones se hicieron a partir del ADN genómico purificado. Se realizó un primer estudio con once cepas aisladas del CVBALP, una de semillas importadas (Cmm97) y la cepa de referencia NCPBP382. Los aislamientos se caracterizaron genéticamente por rep-PCR, utilizando los cebadores BOX (BOXA1R), ERIC (ERIC1R y ERIC2) y REP (REP1R-I y REP2-I) (Versalovic, 1994) (Cuadro B.4.1). La amplificación de los productos se realizó con 75 pmol de cada set de cebadores y 50 ng de templado. Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5 % en buffer TBE 1 X a 5 V/cm por 2,75 h. Los geles se tiñeron con SybrSafe (Invitrogen). Las imágenes digitales de los perfiles obtenidos se analizaron con el programa GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). El grado de similitud entre los perfiles se determinó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r) y los dendogramas se construyeron utilizando el método de agrupamiento de pares no ponderados usando la media aritmética (UPGMA) (de León *et al.*, 2011).

En base a los resultados obtenidos, el resto de las cepas se analizó utilizando el cebador BOX siguiendo el mismo protocolo.

Se analizó la distribución de la varianza de los grupos genéticos en sus componentes jerárquicos dentro y entre las provincias, dentro y entre localidades del CVBALP y dentro y entre años de aislamiento para la finca A. Para las comparaciones entre provincias se analizaron las 52 cepas aisladas de plantas enfermas en cultivos comerciales locales; no se incluyeron las dos cepas obtenidas de semillas importadas ni las dos cepas de referencia. Para la comparación entre localidades, se incluyeron las 35 cepas del CVBALP, única región de la que se dispone información sobre la localidad de procedencia de los aislamientos. Para la comparación entre años se eligió la finca A debido a que era la finca con muestras de años suficientes para realizar este análisis. Estas comparaciones se realizaron con un análisis de la varianza molecular (AMOVA por sus iniciales en inglés) mediante el programa informático Arlequín v. 3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005). Para poder realizar este análisis se generó con el GelCompar una matriz binaria de presencia/ausencia de bandas a partir de las fotografías obtenidas de los fragmentos de ADN amplificados y separados por electroforesis con el cebador BOXA1R. Esta es una matriz n x t donde las n filas representan las bandas y las t columnas representan los aislamientos.

B.3. Amplificación de las secuencias de los genes de patogenicidad presentes en la isla de patogenicidad

Para determinar la presencia de la IP descrita en la cepa NCPPB382 se realizó la amplificación a partir del ADN genómico purificado usando cebadores específicos para los genes de las subregiones *chp* y *tomA*. Se amplificaron los genes *tomA* (*tomA*-F + *tomA*-R), *ppaA* (*ppaA*-F + *ppaA*-R), *chpC* (*chpC*-F + *chpC*-R) y *chpG* (*chpG*-F + *chpG*-R) (Kleitman *et al.*, 2008; Yim *et al.*, 2011) (Cuadro B.4.1). Las amplificaciones se realizaron con GoTaq® DNA Polymerase (Promega) según el protocolo del fabricante, con 25 pmol de cada cebador y 40 ng de templado. Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 90 s a 94 °C, 2 min a temperatura de hibridación (Cuadro B.4.1), y 2 min a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5 % en buffer TBE a 150 V por 1,5 h. Los geles se tiñeron con SybrSafe (Invitrogen).

B.4. Amplificación de las secuencias de los genes de patogenicidad presentes en los plásmidos

Se repicaron las cepas en placas de Petri con medio YDC. Se seleccionó una colonia y se utilizó para inocular 5 ml de caldo nutritivo (Britania ®), en tubos de centrífuga de 15 ml. Luego de dos ciclos de crecimiento a 25 °C - 28 °C por 24 h en agitación a 200 rpm, se centrifugó la suspensión bacteriana obtenida a 10.000 g por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se purificó el ADN plasmídico utilizando un protocolo que consistió en suspender el pellet celular en 200 µl de buffer TE pH 8. Luego, se agregaron 200 µl de acetato de potasio 3 M pH 5,3, se dejó reposar la solución cinco minutos, se agregó 200 µl de una solución de hidróxido de sodio 200 µM y SDS al 1 %, se dejó reposar 5 min en hielo y se centrifugó a 10.000 g por 15 min. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf con 450 µl de isopropanol 100 % a -18 °C. Luego de 20 min se centrifugó a 15.000 g por 15 min, se retiró el sobrenadante y al pellet obtenido se le agregaron 500 µl de etanol 70 % a -18 °C. Se dejó reposar durante una hora, aproximadamente, en freezer de -40 °C, se centrifugó a 10.000 g y los pellets obtenidos se secaron en estufa a 60 °C. Una vez evaporado el alcohol se hidrataron las muestras con 30 µl de TE pH 8. Finalmente se corroboró la presencia de los plásmidos realizando una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8 % en buffer TBE, a 100 V por 1 h.

Se amplificó la secuencia de 551 pb con los cebadores PFC3/5 correspondientes al gen *celA* y la secuencia de 614 pb con los cebadores Cmm5/6 correspondientes al gen *pat-1* (Cuadro B.4.1). Asimismo, se amplificaron las secuencias correspondientes a los genes de replicación de los plásmidos pCM1 y pCM2 de 562 pb y 200 pb con los cebadores repA-pCM1 F/R y repA-pCM2 F/R respectivamente (Cuadro B.4.1).

Todas las amplificaciones se realizaron utilizando muestras de ADN purificado de los plásmidos y de ADN genómico obtenido en el punto B.1, para establecer la posible presencia de los genes en el cromosoma, en caso de que no se encontrasen en los plásmidos.

Cuadro B.4.1: Secuencias de cebadores utilizadas, región objetivo, temperatura de hibridación y tamaño del amplicón esperado:

Nombre	Secuencia 5'a 3'	Región objetivo	Tm (°C)	Amplicón (pb)	Referencia
Cmm-5	GCG AAT AAG CCC ATA TCA A	pat-1		55	Dreier <i>et al</i> , 1997
Cmm-6	CGT CAG GAG GTC GCT AAT A				
PSA-4	TCA TTG GTC AAT TCT GTC TCC C	región intergénica 16S-23S del rARN		63	Pastrik y Rainey, 1999
PSA-R	TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C				
chpG-R	TCG GGG TGT AGA CAA GGA AG	chpG		54	Yim <i>et al</i> , 2011
chpG-F	GAC AAC ATG ACC CTG CAC TG				
chpC-R	GTC AGT TGT GGA AGA TGC TG	chpC		52	Yim <i>et al</i> , 2011
chpC-F	GCT CTT GGG CTA ATG GCC G				
ppaA-R	CCC CGT CTT TGC AAG ACC	ppaA		54	Yim <i>et al</i> , 2011
ppaA-F	CAT GAT ATT GGT GGG GAA AG				
tomA-R	GGT CTC ACG ATC GGA TCC	tomA		52	Yim <i>et al</i> , 2011
tomA-F	CGA ACT CGA CCA GGT TCT CG				

Cuadro B.4.1: continuación.

Nombre	Secuencia 5'a 3'	Región objetivo	Tm (°C)	Amplificación (pb)	Referencia
PEC5	TGT AGC GGT GAG TCG TGG TGA	<i>celI</i>	54	551	Kleinman <i>et al.</i> , 2008
PEC3	GGT ACG AAG TTC GAG ACG AC				
repA-pCM2-R	GGA ACG ACG TCA GGA TGG	pCM2	52	entre 100 y 200	Yim <i>et al.</i> , 2011
repA-pCM2-F	CCT GTG CTT CGA CTT CGA C				
repA-pCM1-R	GTC ATC AAC CAG GAG CAC C	pCM1	54	562	Kleinman <i>et al.</i> , 2008
repA-pCM1-F	GTC AGA ACG TGA GCA AGC G				
REP1R-I	IIIICG ICG ICA TCI GGC	rep-PCR	40		Versalovic <i>et al.</i> , 1994
REP2-I	ICGICT TAT CIG GCC TAC				
ERIC1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	rep-PCR	52		Versalovic <i>et al.</i> , 1994
ERIC2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G				
BOXAIR	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	rep-PCR	53		Versalovic <i>et al.</i> , 1994

B.5. Relación entre la agresividad de las distintas cepas y sus características genéticas.

Se realizaron tres ensayos para determinar la agresividad de un grupo de cepas representativas de cada grupo BOX, procedentes de diferentes localidades del CVBALP, productores y años del aislamiento. En los dos primeros, realizados a fines de otoño y de primavera del 2014, se evaluaron 10 cepas del CVBALP; en el tercero, en el otoño de 2016, se agregaron 5 cepas a las ya analizadas en los ensayos anteriores (=15 cepas del CVBALP). En todos los casos se mantuvo un control no inoculado. Además, en los dos últimos ensayos se incluyeron dos cepas importadas, la NCPPB382 se utilizó como cepa de referencia agresiva y la NCPPB399 como cepa de referencia no agresiva. Se incluyeron cinco repeticiones por tratamiento (cepas).

Las determinaciones se realizaron inoculando plantas de tomate del cultivar ACE 55 (Asgrow Seed Co.). Las plantas se cultivaron en macetas individuales de un litro de capacidad con un sustrato de compost:perlita (4:1, v/v). Se regaron y fertilizaron dos veces por semana con una solución conteniendo 0,4 g nitrato de calcio, 0,27 g nitrato de potasio, 0,27 g fosfato monopotásico y 0,24 g sulfato de magnesio por litro de agua corriente.

Las colonias para preparar el inóculo se obtuvieron en placas con medio YDC, cultivadas a 25 °C- 28 °C. Luego de 48 a 72 h se tomó una colonia para hacer una suspensión en 5 ml de agua destilada estéril. Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Jenway 7315[®]) a 590 nm y se ajustó la concentración celular de la suspensión para obtener un valor de $A_{590} = 0,3$, lo cual equivale a 10^8 UFC ml⁻¹. Por último, se realizó una dilución 1/10 para obtener una concentración final de 10^7 UFC ml⁻¹.

Cuando las plantas tuvieron 6-7 hojas se inocularon ubicando una gota de 20 µl de la suspensión bacteriana en la axila de la segunda hoja. Luego, con una aguja tipo insulina estéril se realizó un pinchazo del tejido vegetal, atravesando la gota de la suspensión bacteriana. Los controles se inocularon con agua destilada estéril. Las plantas se mantuvieron durante todo el experimento en invernadero, con aproximadamente 14 h de luz a humedad y temperatura ambiente (18 °C mínima nocturna, 28°C, máxima diurna).

Se registró el primer día post-inoculación (PDPI) en que las plantas mostraron síntomas de flaccidez en algún folíolo. Desde ese momento, y cada tres o cuatro días, se evaluó la incidencia de hojas con síntomas de marchitamiento por planta hasta que las primeras plantas comenzaron su senescencia o hasta completar un mes luego de la inoculación, según lo que ocurriese primero. Para evaluar el marchitamiento foliar se regaron las plantas el día anterior para no confundir este síntoma con el producido por estrés hídrico. Al finalizar el ensayo, se evaluó la severidad del oscurecimiento vascular, calculado como la proporción del largo total del tallo que presentó decoloración vascular.

Con los datos de la incidencia de hojas marchitas se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) utilizando la siguiente ecuación (Jagger y Richards, 2008):

$$ABCPE = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

n es el número de evaluaciones

y_i es la incidencia de hojas marchitas por planta medida en la fecha de medición t_i (%)

y_{i+1} es la incidencia de hojas marchitas por planta obtenida en la fecha de medición t_{i+1} (%)

$(t_{i+1}-t_i)$ es el intervalo entre dos evaluaciones consecutivas (días)

Los datos se analizaron con un modelo lineal mixto; se anidó el año dentro de la finca, dentro de la localidad (Figuras C.1.4 y C.1.5). También se realizó un análisis de varianza multivariado no paramétrico utilizando el programa estadístico R (R Core Team, 2014).

C

Resultados

C. RESULTADOS

C.1. Aislamiento e identificación de las cepas de C. michiganensis subsp. michiganensis

Se obtuvieron 21 nuevos aislamientos de *Cmm* a partir de plantas enfermas de invernaderos comerciales (13 del CVBALP y ocho de Mendoza), los que sumados a las cepas procedentes de Corrientes y de Tucumán, las dos cepas de referencia y las existentes en la colección, completan las 56 cepas analizadas (Figura C.1.1 y Figura C.1.2).

Las colonias de las cepas de *Cmm* eran amarillas, mucosas, brillantes, circulares y de superficie lisa en el medio YDC (Figura C.1.3a). Al microscopio todas las células fueron Gram +, bastones pleomórficos no agrupados o de a pares en forma de V (Figura C.1.3b) y generaron la reacción de hipersensibilidad en *M. jalapa* (Figura C.1.3c). Algunas colonias eran más mucosas que otras, también hubo aislamientos de color amarillo más intenso que otros (figura C.1.4). Todas las cepas amplificaron el fragmento esperado de 270 pb con los cebadores específicos para esta subespecie PSA 4/R (Figura C.1.5).



Figura C.1.1 Diagrama del origen de las cepas del cinturón verde Buenos Aires-La Plata utilizadas en este trabajo agrupadas por localidad, productor y año y cantidad de aislamientos obtenidos.

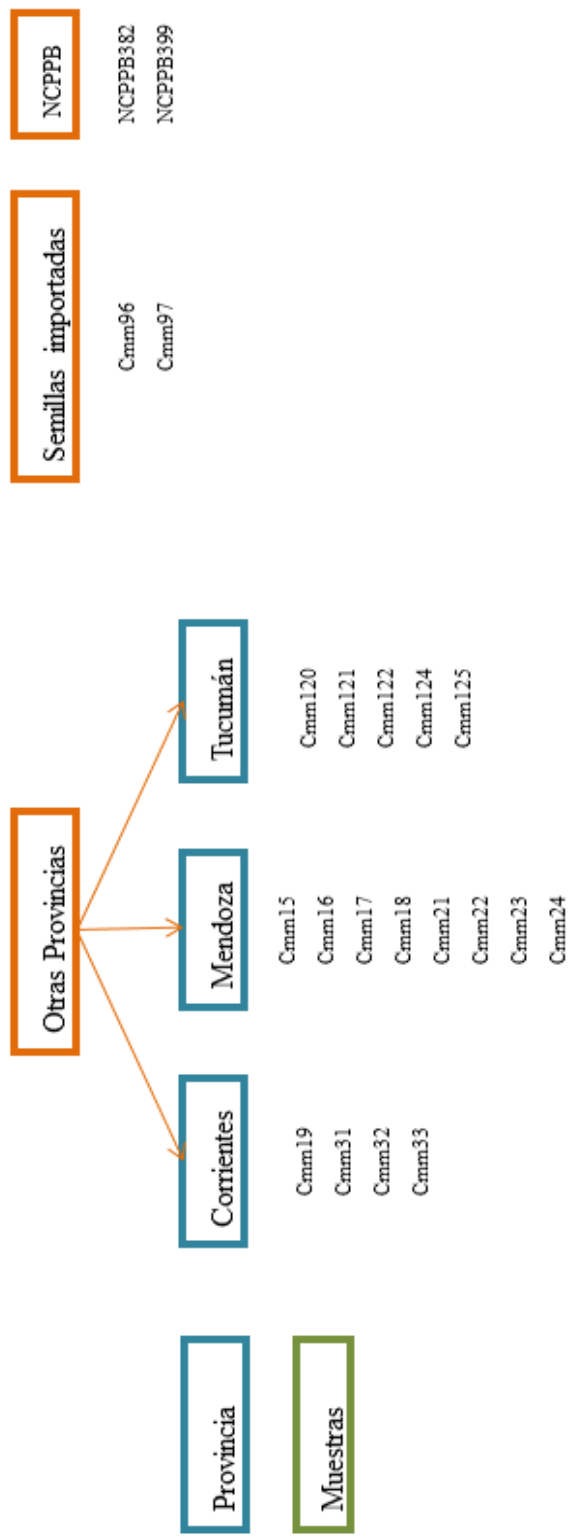


Figura C.1.2 Diagrama de cepas utilizadas en este trabajo. Agrupadas según origen: provincias, semilla importada o colección nacional de bacterias fitopatógenas (NCPBP) del Reino Unido y cantidad de aislamientos.

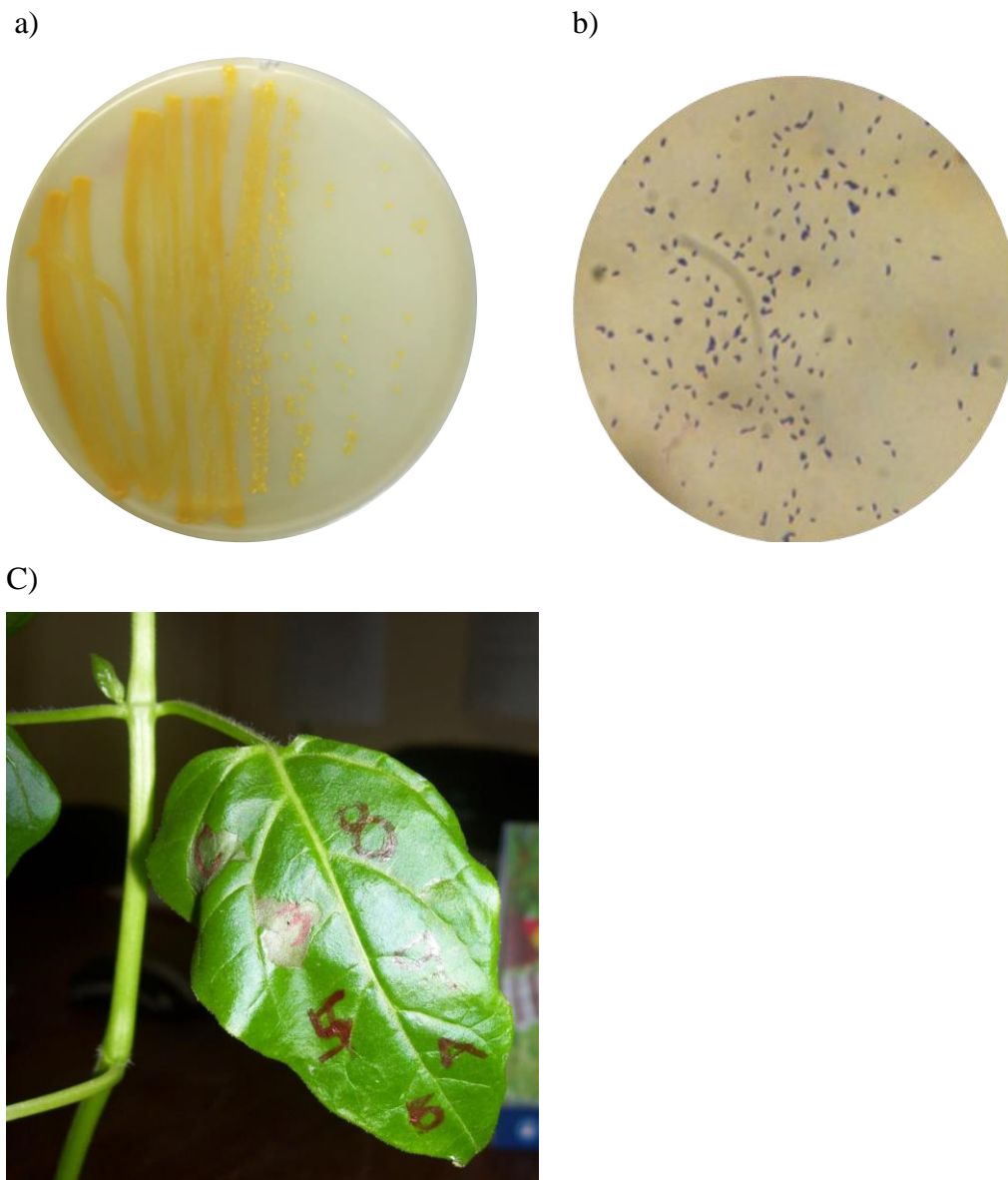


Figura C.1.3 Foto representativa del a) crecimiento en medio YDC y b) observación al microscopio óptico (1.000x) de la tinción de Gram de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, y c) reacción de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa*.



Figura C.1.4 Fotos comparativas de diferentes fenotipos de las cepas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas. Repiques realizados en YDC e incubados según se explica en B. Materiales y métodos. Nótese la textura menos mucosa y más anaranjada de la cepa Cmm66 y el color más claro de la cepa Cmm33.

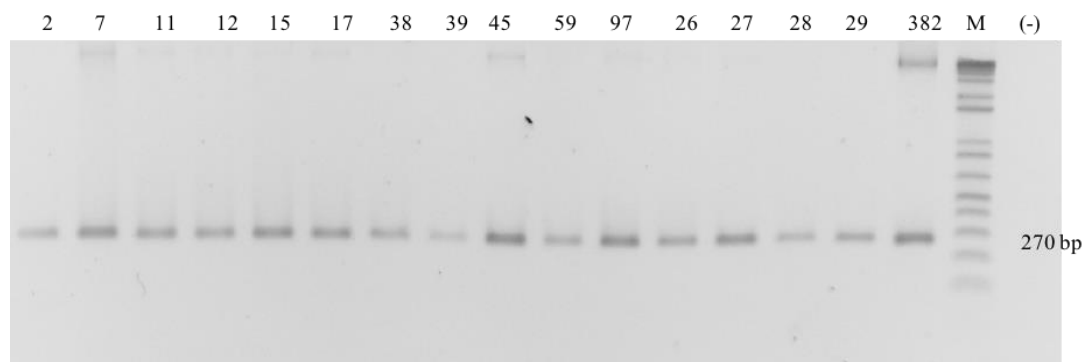


Figura C.1.5 Productos de amplificación de ADN genómico de diferentes cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* obtenidos con los cebadores PSA 4/R resueltos en gel de agarosa 1,2 %. Los números sobre la figura indican la numeración dada a cada cepa. La calle M corresponde al marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen).

C.2. Caracterización de la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

En el análisis preliminar, realizado con 11 cepas procedentes del CVBALP, una aislada de semilla importada (Cmm97) y la cepa de referencia NCPB382 se obtuvieron agrupamientos similares con los tres sets de cebadores, BOX, ERIC y REP (Figura C.2.1).

Realizando los cortes a una similitud del 90 % para BOX y REP y del 85 % para ERIC, con los tres sets se obtuvieron 4 grupos. En todos los casos el grupo I estuvo conformado por las cepas Cmm99, Cmm97, Cmm54, Cmm66, Cmm64, Cmm26 y Cmm11. El grupo II obtenido con los cebadores BOX y ERIC y el grupo III obtenido con el cebador REP estuvieron conformados por las cepas Cmm27, Cmm34, Cmm38 y Cmm58. La cepa Cmm7 siempre fue la única en su grupo al igual que la cepa NCPB382 lo fue en el suyo (Figura C.2.1).

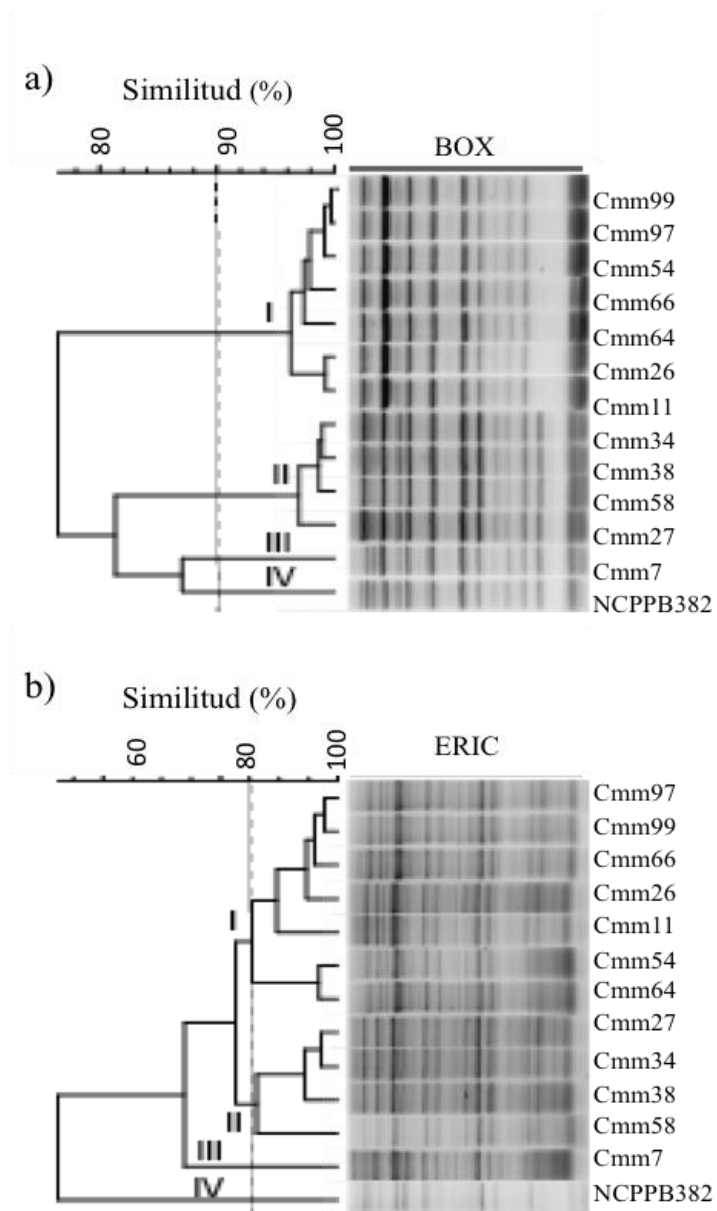


Figura C.2.1 Perfiles de 11 cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas del cinturón verde de Buenos Aires-La Plata, una aislada de semilla importada (Cmm97) y la cepa de referencia NCPB382. a) BOX-PCR b) ERIC-PCR c) REP-PCR. Los perfiles se analizaron con GelCompar como se explica en B. Materiales y métodos.

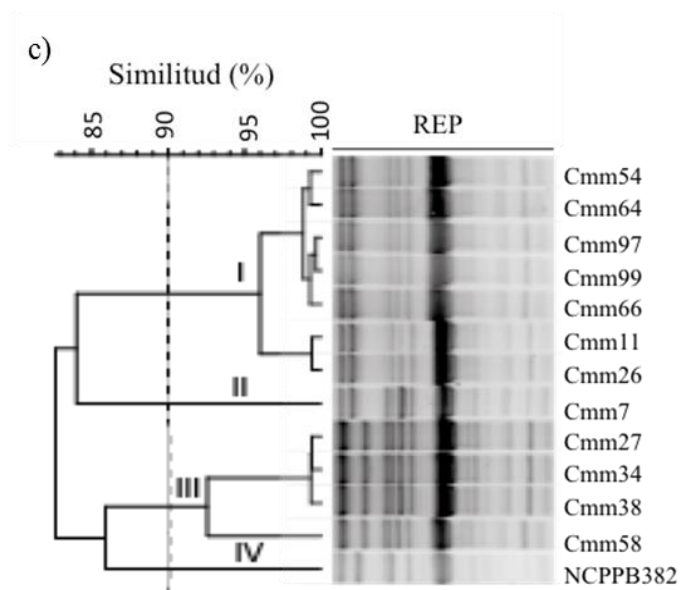


Figura C.2.1 continuación

Debido a que las agrupaciones de las cepas fueron muy similares con los diferentes sets de cebadores, se continuó el análisis de las cepas restantes utilizando el cebador BOX. Los perfiles de las cepas locales generaron tres grupos. Entre las diferencias más notables, el grupo I se diferenció del grupo II por la ausencia en el primero de una banda de poco menos de 1.650 pb y una mayor intensidad en la banda siguiente (Figura C.2.2, a). En el grupo I se resolvió una banda menos que en los otros dos grupos entre los 300 y los 500 pb (figura C.2.2, b). En el grupo III, la banda de un poco más de 1.650 pb es de menor intensidad que la de los grupos I y II (Figura C.2.2, c) y hay una banda de mayor intensidad cerca de las 500 pb (Figura C.2.2, d).

Las cepas de referencia fueron diferentes a las locales, aunque con mayor similitud con el grupo III; NCPPB382 se diferenció de ese grupo porque la banda de mayor intensidad entre 1.650 y 1.000 pb tiene menor tamaño (Figura C.2.2, e). En el caso de NCPPB399, la segunda banda cercana a los 1.650 pb tiene menor intensidad que las del grupo III (Figura C.2.2, f).

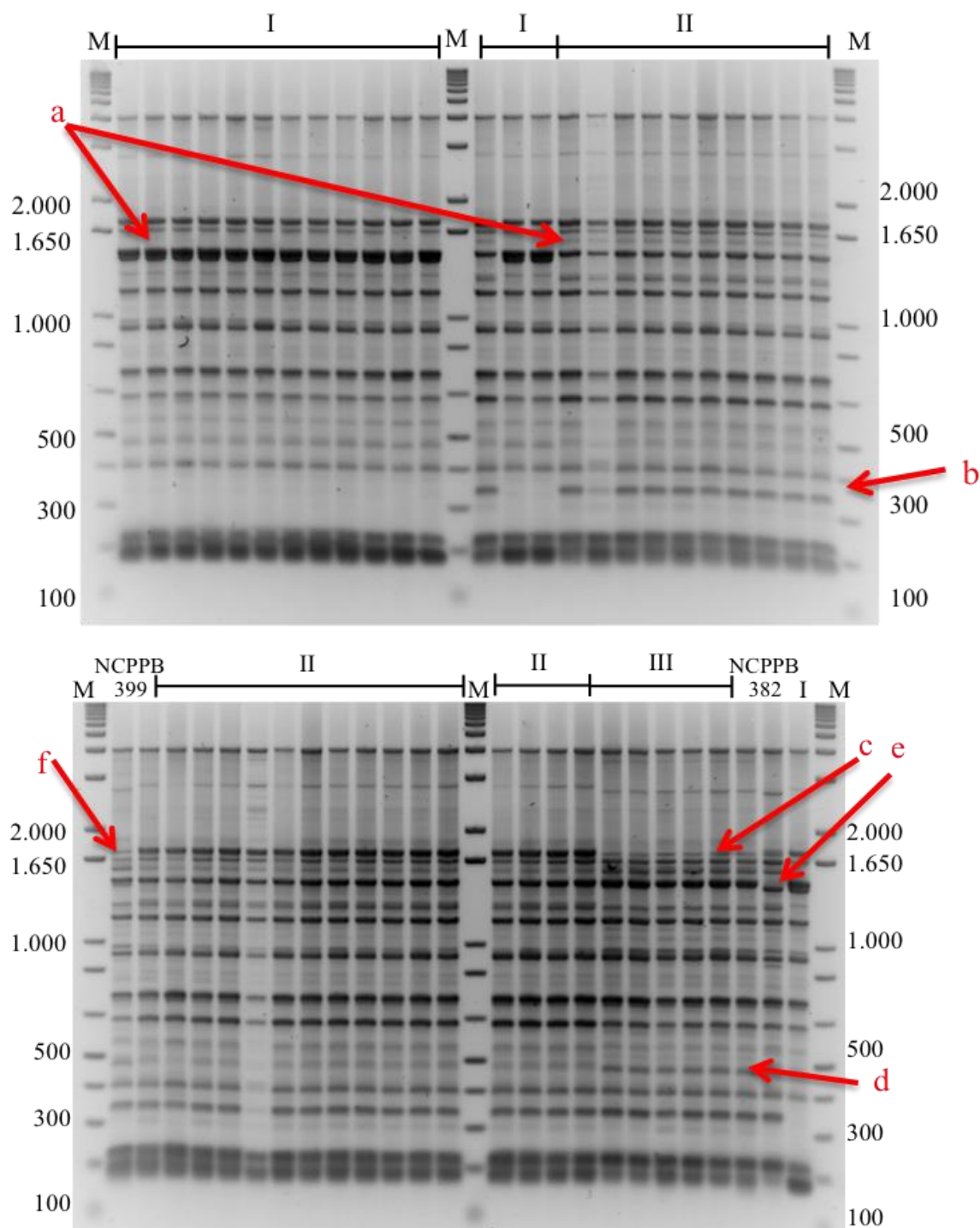


Figura C.2.2 Fotografías de la amplificación con BOX-PCR de 50 cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Las condiciones de amplificación se hicieron como se describe en B. Materiales y Métodos. Los números al costado de la foto muestran el tamaño de bandas correspondientes a los marcadores moleculares 1 kb plus (Invitrogen; M). Las barras superiores marcan grupos de BOX-PCR. Las flechas señalan las bandas polimórficas que resultaron clave para la separación de los grupos.

El dendograma con las 54 cepas locales y las cepas de referencia NCPB382 y NCPB399 considerando una similitud del 88 % generó cinco grupos (Figura C.2.3). Quince cepas conformaron el grupo I, 33 el grupo II y seis el grupo III. Las cepas NCPB382 y NCPB399 no se agruparon con ninguna de las cepas locales, ni entre sí.

No hubo separación en los grupos obtenidos según la provincia de origen de los aislamientos (Cuadro C.2.1). Las cepas aisladas de las localidades de Buenos Aires se ubicaron en todos los grupos al igual que las de Mendoza. Las cepas de Corrientes se distribuyeron en los grupos I y II y las de Tucumán en los grupos II y III. Las dos cepas obtenidas de semilla quedaron incluidas en el grupo II.

En relación con las localidades de Buenos Aires, se aislaron cepas pertenecientes a todos los grupos en Colonia Urquiza, cepas de los grupos I y II en Olmos y Berazategui, cepas del grupo II en Florencio Varela y una cepa del grupo I en la localidad de Arana.

Tampoco se relacionaron los grupos con el año de cultivo; en un mismo muestreo en el invernadero A se aislaron cepas de dos grupos genéticos (Cmm2 y Cmm7, grupos II y III respectivamente). Contrario a esto, todas las cepas aisladas el 2013 del invernadero del productor E pertenecieron al grupo II.

En dos ocasiones se obtuvieron dos o tres aislamientos diferentes de una misma planta enferma, pertenecientes al mismo grupo genético en un caso, o a grupos diferentes en el otro. Así, las cepas Cmm30 y Cmm90, aisladas de una misma planta, pertenecieron al grupo II. Por el contrario, la cepa Cmm94, aislada de peciolo, correspondió al grupo genético I, mientras que las Cmm95 y Cmm98, procedentes de diferentes secciones del tallo de la misma planta, pertenecieron al grupo genético II.

Al analizar la distribución de los componentes de la varianza molecular de los perfiles obtenidos con el cebador BOX entre las principales provincias productoras del país (Buenos Aires, Corrientes, Mendoza y Tucumán), se evidenció que la mayor parte de la varianza es intra-provincial (96 %) y no entre provincias. El índice de fijación entre las poblaciones es $\phi = 0,04$, $P < 0,16$ (Cuadro C.2.2). Por su parte, el análisis de varianza molecular de los perfiles obtenidos con el cebador BOX para las cepas del CVBALP, de donde se tiene información sobre la localidad de procedencia de las cepas, mostró que el total de la variabilidad se encontró dentro de las localidades con un índice de fijación entre poblaciones $\phi = 0$, $P = 1$ (Cuadro C.2.3). La varianza entre años para la finca A del CVBALP fue mayor dentro de cada año (90 %) que entre los años (10 %) con un índice de fijación $\phi = 0,099$, $P = 0,1$ (Cuadro C.2.4). En ninguno de los tres casos el análisis fue significativo, y en todos ellos la potencia de la prueba (ϕ) fue baja, probablemente debido al bajo número de muestras obtenidas en algunas localidades, provincias y años.

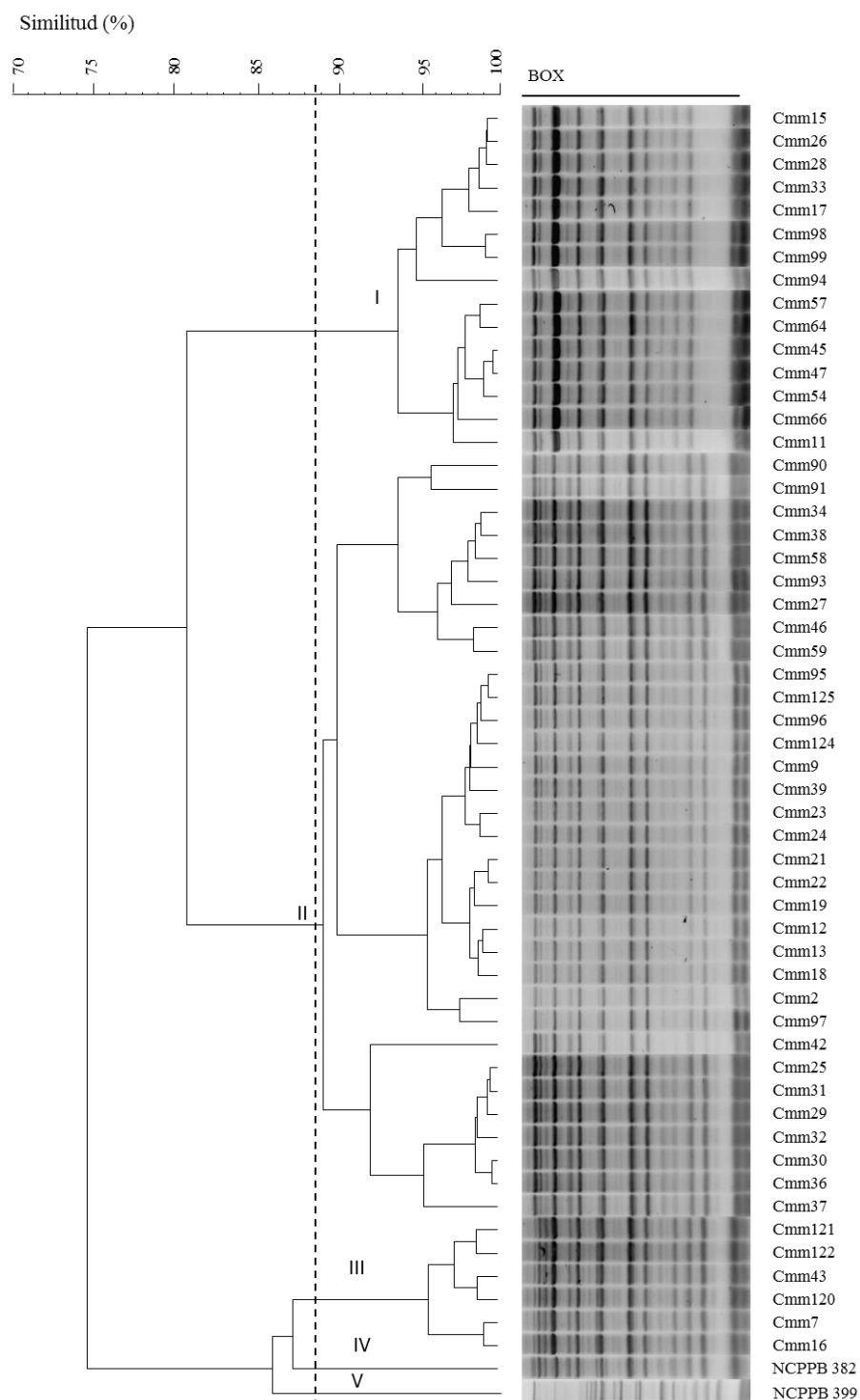


Figura C.2.3 Perfil de BOX-PCR de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este trabajo. Las condiciones de amplificación y los análisis se hicieron como se describe en la sección B. Materiales y Métodos. Números en el eje horizontal superior indican el porcentaje de similitud. La columna en el lado derecho muestra la denominación de las cepas.

Cuadro C.2.1 Origen de las cepas analizadas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, año de aislamiento y resultado de la agrupación por BOX-PCR.

Cepa	Provincia/localidad	Productor	Año	Hibrido	Grupo BOX
Cmm11	BsAs/ Colonia Urquiza	A	2001	Maita	I
Cmm45	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2010		I
Cmm47	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2010		I
Cmm94 ^{a1}	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2011		I
Cmm98 ^a	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2011		I
Cmm99	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2011		I
Cmm26	BsAs/Colonia Urquiza	A	Verano 2011-2012		I
Cmm28	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Verano 2011-2012		I
Cmm54	BsAs/Arana	D	2002	Eco	I
Cmm57	BsAs/Berazategui	B	2009	Elpida	I
Cmm66	BsAs/Berazategui	B	2012	Elpida	I
Cmm64	BsAs/Olmos	C	2011	Elpida	I
Cmm33	Corrientes ²		2011	Elpida	I
Cmm15	Mendoza		2013		I
Cmm17	Mendoza		2013		I
Cmm2	BsAs/ Colonia Urquiza	A	2000		II
Cmm9	BsAs/ Colonia Urquiza	A	2000	Dominique	II
Cmm12	BsAs/ Colonia Urquiza	A	2001		II
Cmm13	BsAs/Colonia Urquiza	A	2001		II
Cmm42	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2010		II
Cmm46	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2010		II
Cmm91	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2011		II
Cmm93	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2011		II
Cmm95 ^a	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2011		II
Cmm90 ^b	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Verano 2011		II
Cmm25	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Verano 2011-2012		II
Cmm27	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Verano 2011-2012		II
Cmm29	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Verano 2011-2012		II
Cmm30 ^b	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Verano 2011-2012		II
Cmm58	BsAs/Berazategui	B	2009	Elpida	II
Cmm59	BsAs/Berazategui	B	2009	Elpida	II
Cmm37	BsAs/Florencio Varela	E	2013	Roger	II
Cmm38	BsAs/Florencio Varela	E	2013	Roger	II
Cmm39	BsAs/Florencio Varela	E	2013	Roger	II
Cmm34	BsAs/Florencio Varela		2011		II
Cmm36	BsAs/Olmos	F	2012	Griffy	II
Cmm32	Corrientes ²		2011	Ikram	II
Cmm31	Corrientes ²		2012	Paronset	II

Cuadro C.2.1 Continuación.

Cepa	Provincia/localidad	Productor	Año	Hibrido	Grupo BOX
Cmm19	Corrientes ²		2013		II
Cmm18	Mendoza		2013		II
Cmm21	Mendoza	Verano 2012		Griffy	II
Cmm22	Mendoza	Verano 2012		Paronset	II
Cmm23	Mendoza	Verano 2012		Elpida	II
Cmm24	Mendoza	Verano 2012		Torry	II
Cmm96	Semilla importada	Invierno 2011			II
Cmm97	Semilla importada	Invierno 2011			II
Cmm124	Tucuman ³				II
Cmm125	Tucuman ³				II
Cmm7	BsAs/ Colonia Urquiza	A	2000	Dominique	III
Cmm43	BsAs/ Colonia Urquiza	A	Invierno 2010		III
Cmm16	Mendoza		2013		III
Cmm120	Tucuman ³				III
Cmm121	Tucuman ³				III
Cmm122	Tucuman ³				III
NCPPB382	Reino Unido		1956		IV
NCPPB399	Reino Unido		1957		V

¹La misma letra (a o b) indica que las cepas se aislaron de una misma planta.

²Cepa provista por la Ing. Agr. Verónica G. Obregón de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Bella Vista del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

³Cepa provista por el Ing. Agr. Ceferino R. Flores de la EEA Yuto del INTA.

Cuadro C.2.2 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 52 aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* del cinturón verde Buenos Aires-La Plata, Corrientes, Mendoza y Tucumán a partir de la información obtenida con el cebador BOXA1R. ($\varphi=0,04$, $P<0,16$)

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la varianza
Entre provincias	3	12	0,13	4
Dentro de las provincias	48	135	2,82	96
Total	51	147	2,95	

Cuadro C.2.3 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 35 aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* del cinturón verde Buenos Aires-La Plata a partir de la información obtenida con el cebador BOXA1R. ($\varphi=0$, $P<1$)

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la varianza
Entre localidades	4	2	0	0
Dentro de las localidades	30	14,5	0,5	100
Total	34	16,5	0,5	

Cuadro C.2.4 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 24 aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de la finca A del cinturón verde Buenos Aires-La Plata a partir de la información obtenida con el cebador BOXA1R. ($\varphi=0,099$, $P<0,1$)

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la varianza
Entre años	4	14,6	0,2	10
Dentro de los años	19	45,8	2,4	90
Total	23	60,4	2,6	

C.3. Genes de patogenicidad presentes en la isla de patogenicidad del cromosoma y en los plásmidos

En todas las cepas estudiadas se obtuvieron los productos de amplificación esperados para los genes de la IP: *tomA*, *ppaA*, *chpC* y *chpG* (Figura C.3.1). Al usar el ADN genómico todas las cepas, excepto una, amplificaron la secuencia correspondiente al plásmido pCM2 (entre 100 y 200 pb), mientras que en solo seis cepas se observó la banda de 562 pb correspondiente al plásmido pCM1 (Cuadro C.3.1). La cepa de referencia NCPPB382 amplificó las secuencias correspondientes a los dos plásmidos, mientras que la NCPPB399 no amplificó la de ninguno de los dos.

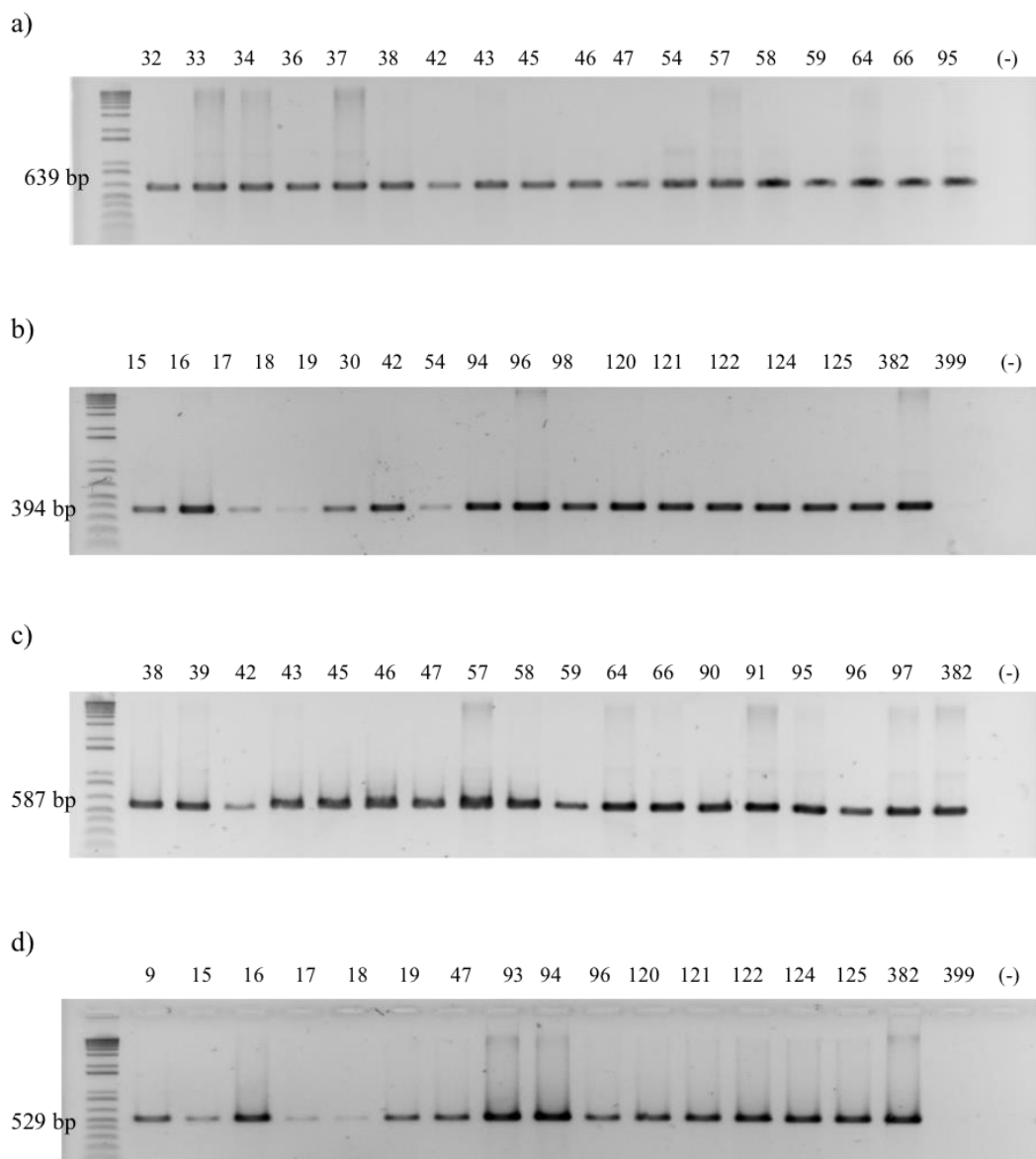


Figura C.3.1 Productos de amplificación de los genes a) *chpC* b) *chpG* c) *ppaA* y d) *tomA* a partir de ADN genómico y resueltos en gel de agarosa 1,5 %, según se describió en B. Materiales y Métodos. Los números sobre la figura indican la numeración dada a cada cepa, la primera columna de la izquierda corresponde al marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen).

Cuadro C.3.1 Resultado de la amplificación de ADN genómico de los genes de la isla de patogenicidad y de las secuencias de replicación de los plásmidos pCM1 y pCM2 de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este estudio

Grupo BOX	Cepa	Isla de Patogenicidad				Plásmidos			
		<i>chpC</i>	<i>chpG</i>	<i>ppaA</i>	<i>tomA</i>	<i>repA-pCM1</i>	<i>repA-pCM2</i>	<i>pat-1</i>	<i>celA</i>
I	Cmm11	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm15	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm17	+	+	+	+	+	+	+	+
I	Cmm26	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm28	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm33	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm45	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm47	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm57	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm58	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm66	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm90	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm95	+	+	+	+	-	+	+	+
I	Cmm99	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm2	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm9	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm12	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm18	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm19	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm21	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm22	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm23	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm24	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm25	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm27	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm29	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm30	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm31	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm32	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm34	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm36	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm37	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm38	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm39	+	+	+	+	-	+	+	+

Cuadro C.3.1 Continuación

Grupo BOX	Cepa	Isla de Patogenicidad				Plásmidos			
		<i>chpC</i>	<i>chpG</i>	<i>ppaA</i>	<i>tomA</i>	<i>repA-pCM1</i>	<i>repA-pCM2</i>	<i>pat-1</i>	<i>celA</i>
II	Cmm42	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm46	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm59	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm64	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm91	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm93	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm94	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm96	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm97	+	+	+	+	-	+	+	+
II	Cmm98	+	+	+	+	-	-	+	+
II	Cmm 125	+	+	+	+	-	+	+	+
III	Cmm7	+	+	+	+	+	+	+	+
III	Cmm16	+	+	+	+	+	+	+	+
III	Cmm43	+	+	+	+	+	+	+	+
III	Cmm 121	+	+	+	+	+	+	+	+
III	Cmm 122	+	+	+	+	+	+	+	+
III	Cmm 124	+	+	+	+	-	+	+	+
IV	NCPB382	+	+	+	+	+	+	+	+
V	NCPB399	-	-	-	+	-	-	-	-

En todas las cepas se observaron los productos de amplificación de las secuencias *pat-1* y *celA*. El primero se observó tanto en los geles que correspondían a las extracciones del ADN genómico como los realizados con los productos de amplificación del ADN plasmídico. Para la secuencia *celA* hubo un caso, la cepa Cmm21, en el cual el producto de amplificación se observó en los geles realizados con el ADN genómico, pero no en los de ADN plasmídico; esa cepa tampoco amplificó la secuencia específica del plásmido correspondiente, pCM1.

El amplicón correspondiente a *celA* se observó en las 44 cepas en las que no amplificó la secuencia *repA-pCM1*. Además, la secuencia correspondiente al plásmido pCM1 solamente amplificó en cepas cuyo perfil genético correspondía al grupo III de BOX-PCR y en una cepa de Mendoza del grupo I (Figura C.3.2 y Cuadros C.3.1 a C.3.3).

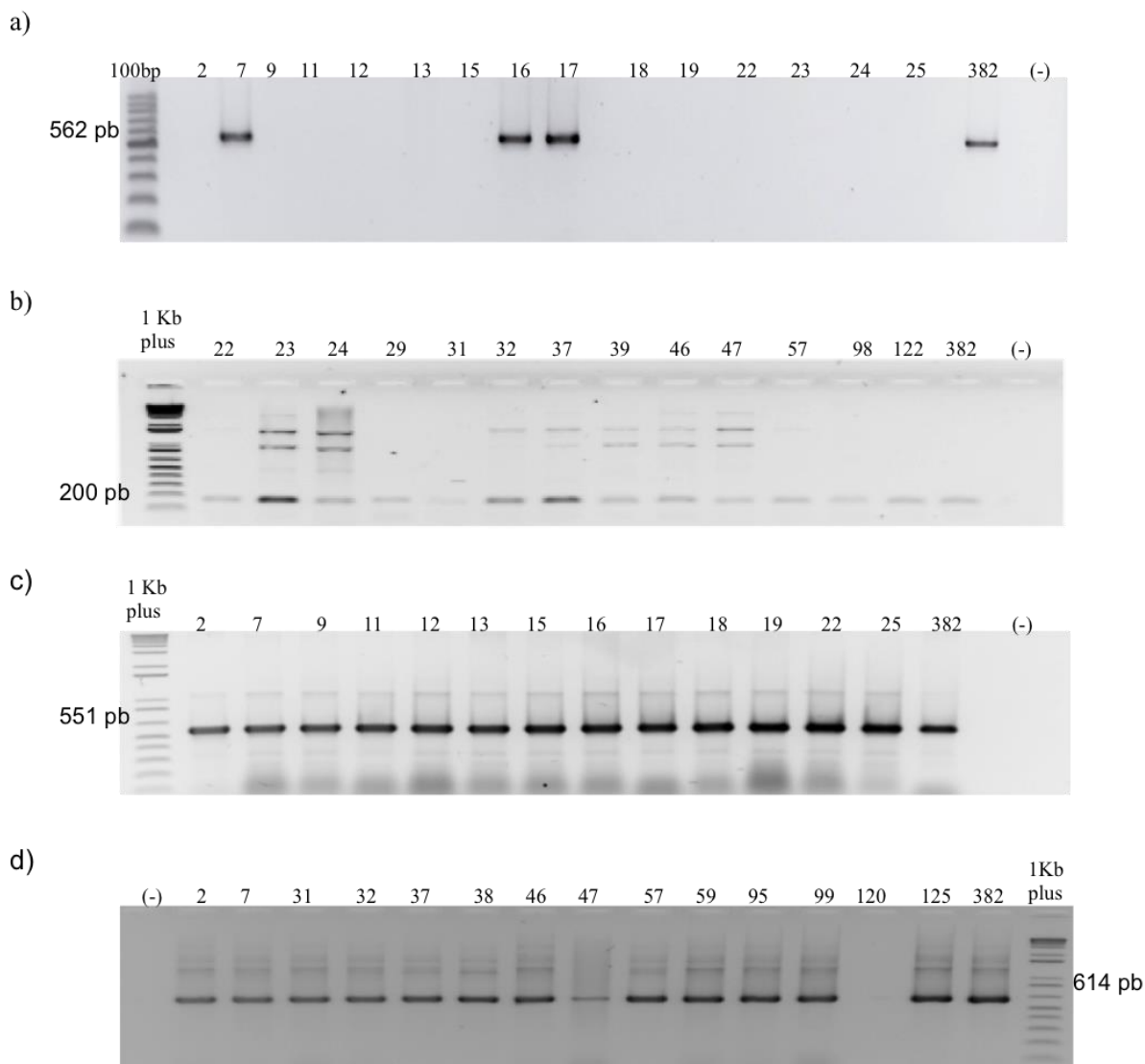


Figura C.3.2 Productos de amplificación del gen de replicación de los plásmidos a) pCM1 y b) pCM2 y los genes de patogenicidad presentes en cada uno de ellos, c) *celA* y d) *pat-1* amplificados a partir del ADN de los plásmidos purificados como se explica en B. Materiales y Métodos en gel de agarosa 1,5 %. Números arriba de cada columna indican el número asignado a la cepa. Primera columna de la izquierda: Marcador molecular en a) 100 bp (Promega), en b), c) y d) 1 kb plus (Invitrogen).

Cuadro C.3.2 Resultado de la amplificación a partir de ADN plasmídico de los genes de patogenicidad y de las secuencias de replicación de los plásmidos pCM1 y pCM2 de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este estudio

Grupo BOX	Cepa	<i>repA-pCM1</i>	<i>repA-pCM2</i>	<i>celA</i>	<i>pat-1</i>
I	Cmm11	-	+	+	+
I	Cmm15	-	+	+	+
I	Cmm17	+	+	+	+
I	Cmm26	-	+	+	+
I	Cmm28	-	+	+	+
I	Cmm33	-	+	+	+
I	Cmm45	-	+	+	+
I	Cmm47	-	+	+	+
I	Cmm54	-	+	+	+
I	Cmm57	-	+	+	+
I	Cmm58	-	+	+	+
I	Cmm66	-	+	+	+
I	Cmm90	-	+	+	+
I	Cmm95	-	+	+	+
I	Cmm99	-	+	+	+
II	Cmm2	-	+	+	+
II	Cmm9	-	+	+	+
II	Cmm12	-	+	+	+
II	Cmm18	-	+	+	+
II	Cmm19	-	+	+	+
II	Cmm21	-	+	-	+
II	Cmm22	-	+	+	+
II	Cmm23	-	+	+	+
II	Cmm24	-	+	+	+
II	Cmm25	-	+	+	+
II	Cmm27	-	+	+	+
II	Cmm29	-	+	+	+
II	Cmm30	-	+	+	+
II	Cmm31	-	+	+	+
II	Cmm32	-	+	+	+
II	Cmm34	-	+	+	+
II	Cmm37	-	+	+	+
II	Cmm38	-	+	+	+
II	Cmm39	-	+	+	+

Cuadro C.3.2 Continuación

Grupo BOX	Cepa	<i>repA-pCM1</i>	<i>repA-pCM2</i>	<i>celA</i>	<i>pat-1</i>
II	Cmm42	-	+	+	+
II	Cmm46	-	+	+	+
II	Cmm59	-	+	+	+
II	Cmm64	-	+	+	+
II	Cmm91	-	+	+	+
II	Cmm93	-	+	+	+
II	Cmm96	-	+	+	+
II	Cmm97	-	+	+	+
II	Cmm98	-	-	+	+
II	Cmm125	-	+	+	+
III	Cmm7	+	+	+	+
III	Cmm16	+	+	+	+
III	Cmm43	+	+	+	+
III	Cmm121	+	+	+	+
III	Cmm122	+	+	+	+
III	Cmm124	-	+	+	+
	NCPB382	+	+	+	+

Cuadro C.3.3 a) presencia/ausencia de la secuencia *repA-pCM1* y presencia/ausencia de la secuencia del gen *celA*, b) presencia/ausencia de la secuencia *repA-pCM2* y de la secuencia del gen *pat-1* de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas en Argentina utilizadas en este estudio, obtenidas a partir del ADN plasmídico.

a)		<i>celA</i>		Total
		si	no	
<i>repA-pCM1</i>	si	6	0	6
	no	43	1	44
total		49	1	50

b)		<i>pat-1</i>		Total
		si	no	
<i>repA-pCM2</i>	si	49	0	49
	no	1	0	1
total		50	0	50

C.4. Determinación de la agresividad de las distintas cepas y su relación con sus características genéticas.

Se evaluó la agresividad de 15 cepas de *Cmm* procedentes del CVBALP. Del total de cepas analizadas, 6 pertenecieron al grupo genético I, 8 al grupo II y la *Cmm7* que era la única cepa caracterizada al momento de los ensayos como perteneciente al grupo III. Los controles no inoculados permanecieron sanos en todos los ensayos.

Hubo mucha variabilidad entre repeticiones para todos los parámetros medidos, lo cual en general no permitió detectar diferencias significativas entre cepas. Solo en la medición de severidad en tallo y ABCPE de otoño de 2014 se observaron diferencias significativas, pero las mismas no se relacionaron con los grupos BOX (Cuadro y Figura C.4.1).

El análisis de las variables con las cepas agrupadas según los resultados obtenidos con BOX-PCR, mostró que el grupo III, conformado por la cepa *Cmm7*, estuvo relacionado con un mayor PDPI y una menor severidad en tallo que las cepas del grupo II, en los ensayos de primavera de 2014 y otoño de 2016, respectivamente ($p < 0,05$; Cuadro y Figura C.4.2). El ABCPE tuvo una tendencia similar a la severidad del oscurecimiento del tallo, aunque las diferencias no fueron significativas.

Mediante un análisis multivariado considerando las tres variables se determinaron diferencias entre las cepas del grupo II y la cepa perteneciente al grupo III en el segundo ensayo ($F=3,417$; $P < 0,05$). En los otros ensayos las diferencias no fueron significativas pero las tendencias se mantuvieron.

Las cepas de referencia NCPB382 y NCPB399 presentaron una agresividad intermedia a baja con respecto a las cepas locales (Cuadros y Figura C.4.1 y C.4.2), y no hubo diferencias entre ellas en relación con el ABCPE que indujeron en las plantas, el PDPI o la severidad del oscurecimiento que ocasionaron en el tallo de las plantas inoculadas (Cuadro y Figura C.4.1).

Se compararon los resultados obtenidos en los tres ensayos hasta un mes después de la inoculación con un análisis de Kruskal Wallis; las medias se compararon con el test de t múltiple de Bonferroni. Los mayores niveles de ABCPE y los menores de PDPI se observaron en otoño y primavera del 2014, comparados con el otoño del 2016 ($p < 0,05$). La severidad en tallo fue diferente entre otoño y primavera del 2014 ($p < 0,05$; Cuadro y Figura C.4.3).

Cuadro C.4.1: Análisis de la varianza de la caracterización de la agresividad de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este trabajo en tres ensayos diferentes. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), primer día post inoculación en que se observaron síntomas (PDPI) y severidad de la decoloración vascular en tallo. El asterisco a la derecha del valor P señala que hubo diferencias significativas.

Otoño 2014

ABCPE

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Cepa	9	359,4	39,93	2,130	0,0493*
Error	40	749,5	18,74		

PDPI

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Cepa	9	94,9	10,54	0,327	0,961
Error	40	1288,4	32,21		

Severidad en tallo

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Cepa	9	3	0,3344	6,227	1 10 ⁻⁰⁵ *
Error	40	2	0,0537		

Cuadro C.4.1: continuación

Primavera 2014

ABCPE

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Cepa	11	324	29,45	0,777	0,661
Error	48	1819	37,9		

PDPI

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Cepa	11	292,6	26,6	0,786	0,652
Error	48	1624,5	33,84		

Severidad en tallo

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Cepa	11	0,4971	0,0452	1,525	0,154
Error	48	14,230	0,02965		

Otoño 2016

ABCPE

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Cepa	13	0,0418	0,003216	1,741	0,0772
Error	56	0,1034	0,001847		

PDPI

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Cepa	13	802,7	61,75	1,842	0,0586
Error	56	1877,3	33,52		

Severidad en tallo

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Cepa	13	1,211	0,09312	1,426	0,177
Error	56	3,658	0,06532		

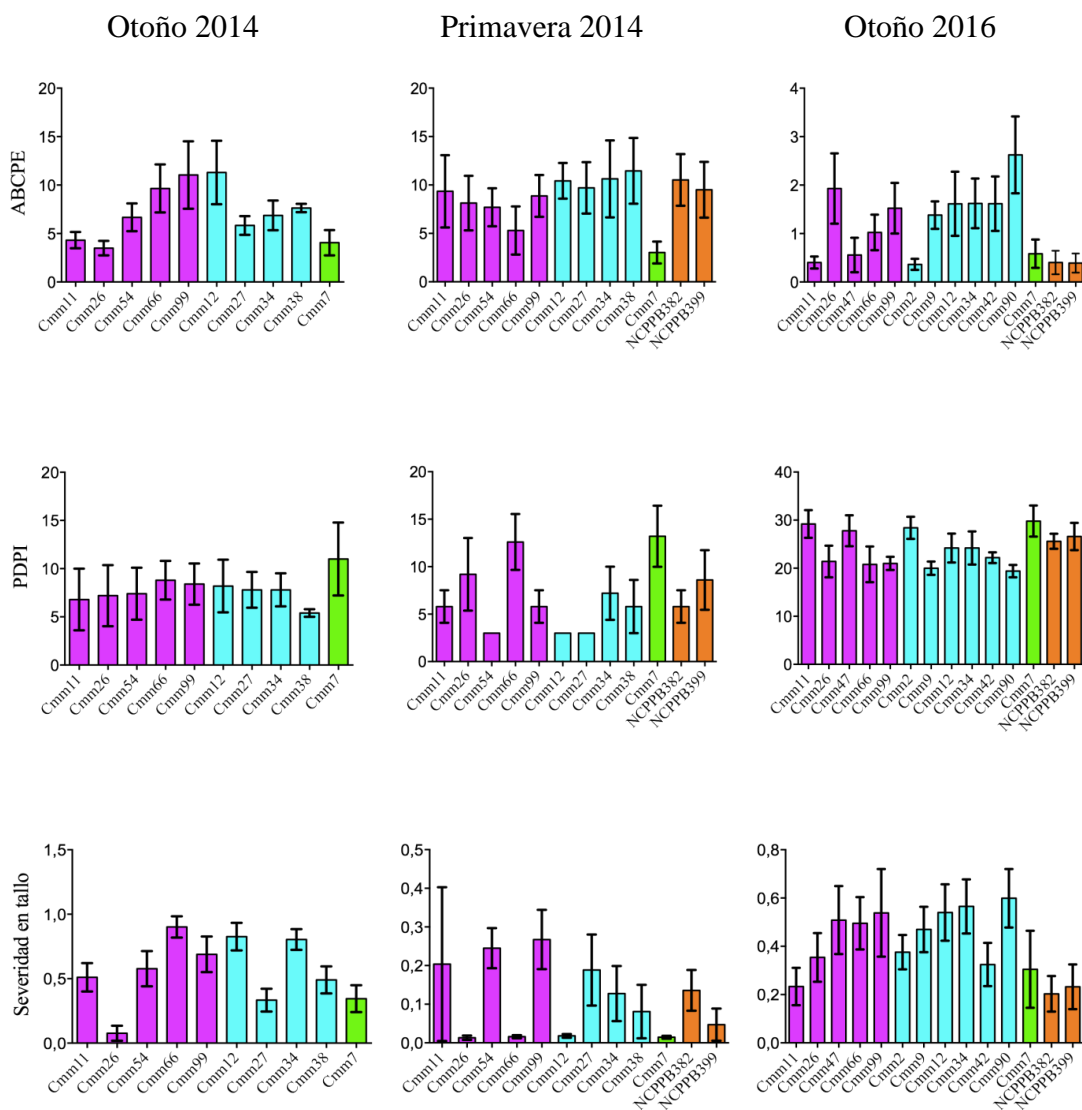


Figura C.4.1 Caracterización de la agresividad de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este trabajo en tres ensayos diferentes. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), primer día post inoculación en que se observaron síntomas (PDPI) y severidad de la decoloración vascular en tallo. Las barras representan la media de cinco repeticiones; las barras de error representan el error estandar de la media. Rosa, grupo BOX I; celeste, grupo BOX II; verde, grupo BOX III y naranja: cepas de referencia obtenidas de la colección nacional de bacterias fitopatógenas del Reino Unido

Cuadro C.4.2: Análisis de la varianza de la caracterización de la agresividad de los grupos BOX de cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este trabajo en tres ensayos diferentes. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), primer día post inoculación en que se observaron síntomas (PDPI) y severidad de la decoloración vascular en tallo. El asterisco a la derecha del valor P señala que hubo diferencias significativas.

Otoño 2014

ABCPE

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Grupo	2	59,4	29,72	1,331	0,274
Error	47	1045,5	22,33		

PDPI

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Grupo	2	56	28,02	0,992	0,378
Error	47	1327	28,24		

Severidad en tallo

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Grupo	2	0,29	0,1452	1,401	0,256
Error	47	5	0,1036		

Cuadro C.4.2: continuación

Primavera 2014

ABCPE

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Grupo	3	264,2	88,08	2,625	0,0593
Error	56	1878,7	33,55		

PDPI

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Grupo	3	295,4	98,46	3,207	0,0299*
Error	56	1719,2	30,7		

Severidad en tallo

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Grupo	3	0,0873	0,0291	0,889	0,452
Error	56	1,8328	0,03273		

Otoño 2016

ABCPE

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Grupo	3	0,01048	0,003494	1,712	0,173
Error	66	0,13473	0,002041		

PDPI

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Grupo	3	189,3	63,11	1,604	0,197
Error	66	2596,1	39,34		

Severidad en tallo

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Grupo	3	0,551	0,18379	2,809	0,0462*
Error	66	4,317	0,06541		

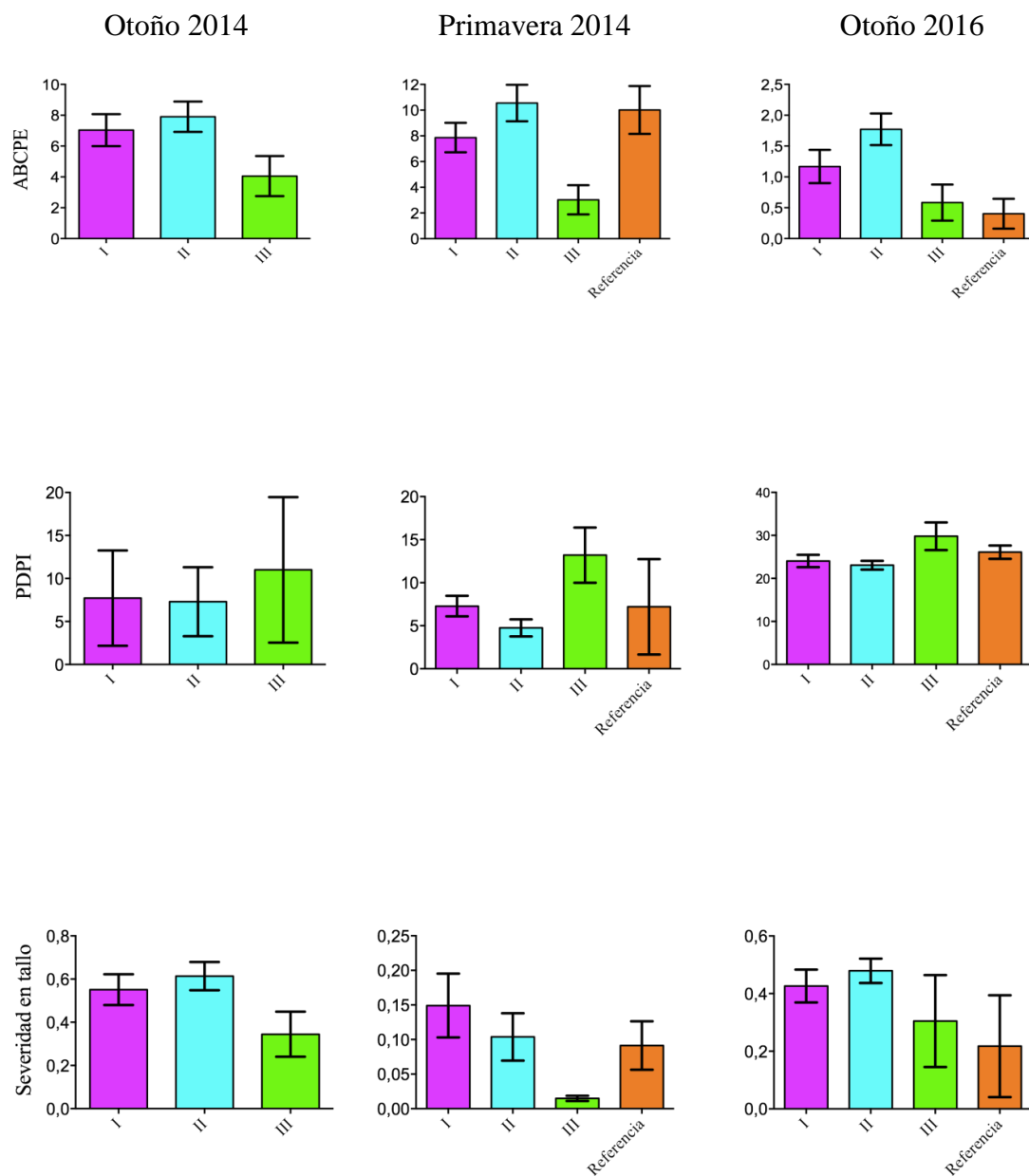


Figura C.4.2 Caracterización de la agresividad promedio de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* según los grupos de BOX, en tres ensayos diferentes. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) primer día post inoculación (PDPI) en que se observaron síntomas y severidad de la decoloración vascular en tallo. Las barras representan la media de 5 repeticiones; las barras de error representan el error estandar de la media.

Cuadro C.4.3: Análisis de la varianza de Kruskal Wallis de la caracterización de la agresividad de los ensayos realizados con cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), primer día post inoculación en que se observaron síntomas (PDPI) y severidad de la decoloración vascular en tallo. El asterisco a la derecha del valor P señala que hubo diferencias significativas.

	Grados de libertad	Chi-cuadrado	P
ABCPE	2	85,51	2 10 ⁻¹⁶ *
DPI	2	71,35	3 10 ⁻¹⁶ *
Severidad en Tallo	2	52,18	4 10 ⁻¹² *

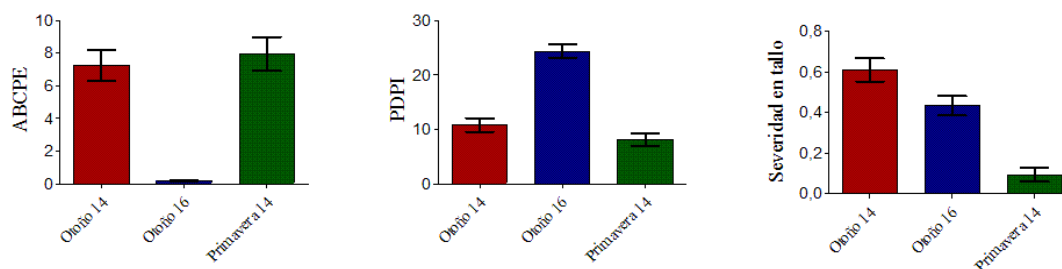


Figura C.4.3 Caracterización de la agresividad promedio de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* según el ensayo. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) primer día post inoculación (PDPI) en que se observaron síntomas y severidad de la decoloración vascular en tallo. Las barras representan la media de 35 repeticiones (siete cepas por cinco repeticiones); las barras de error representan el error estándar de la media.

D

Discusión

D. DISCUSIÓN

La variabilidad genética entre las cepas analizadas en este trabajo resultó moderada al compararla con la observada en otros estudios. Por ejemplo, en Nueva York e Irán se identificaron seis grupos con una similitud del 78,5 % (Louws *et al.*, 1998; Tancos *et al.*, 2015) y del 55% (Nazari *et al.*, 2007), respectivamente. En tanto que en Israel, Japón e Italia se identificaron cuatro grupos con una similitud del 70 %, 90 % y 85 %, respectivamente (Kawaguchi *et al.*, 2010; Kleitman *et al.*, 2008; Ialacci *et al.*, 2015). El menor número de grupos detectados y la elevada similitud entre las cepas aisladas en Argentina podría ser el resultado del ingreso de semillas infectadas/infestadas provistas por un número limitado de importadores, quienes luego serán los proveedores para la generación de los plantines de tomate. También se debe considerar que un mayor número de aislamientos analizados podría resultar en un mayor número de grupos. Esta reducida variabilidad genética entre cepas también se puso en evidencia en el aspecto que presentó el crecimiento bacteriano sobre el medio YDC. En otros estudios se describieron cepas que produjeron colonias con mayor variabilidad en el color: desde amarillas pálidas a naranjas brillantes o rosadas (Saperstein *et al.*, 1954; Hadas *et al.*, 2005). El color de las colonias se debe a la producción de pigmentos del tipo de los carotenoides y licopeno (Saperstein *et al.*, 1954), los cuales están relacionados con la supervivencia epifítica de *Clavibacter michiganensis* spp. (Jacobs *et al.*, 2005). A pesar de que en nuestro trabajo no hubo relación entre la variabilidad de pigmentación en medio YDC y los grupos de BOX-PCR, Yim *et al.* (2011) observaron que cepas con una pigmentación más anaranjada que la típicamente presentada por la bacteria *Cmm*, mostraban también diferencias en los perfiles genéticos generados por rep-PCR. Por su parte, Alvarez y Kaneshiro (2004) informaron de la presencia de cepas de tonalidades amarillas más claras y otras de color naranja y aspecto seco en las semillas de tomate. En ambos casos dichas cepas fueron identificadas recientemente como nuevas subespecies de *C. michiganensis*, no patógenas en tomate (Yasuhara-Bell y Alvarez, 2015; Oh *et al.*, 2016).

Entre los aislamientos locales la mayoría de los procedentes de Tucumán pertenecieron al grupo menos representado en el resto del país. El hallazgo de un grupo predominante en una determinada región, al cual pertenecen la mayoría de las cepas, también fue reportado en otros trabajos (Nazari *et al.*, 2007; Quesada-Ocampo *et al.*, 2012; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2015; Ialacci *et al.*, 2015). En algunos casos, el grupo predominante fue variando según las diferentes zonas de un mismo estado (Quesada-Ocampo *et al.*, 2012). Esto se podría deber a diferencias en la fuente de inóculo primario derivado de un determinado proveedor de semillas o plantines, o a diferencias en la adaptabilidad y supervivencia de las cepas a distintos ambientes.

El conocimiento de la variabilidad genética de un patógeno es una herramienta útil para inferir su posible origen. La detección de un mismo haplotipo en una misma finca en años diferentes se relaciona con la persistencia local del patógeno, mientras que si los haplotipos difieren se puede inferir la reintroducción del patógeno con la semilla (Milijašević-Marčić *et al.*, 2012). En este trabajo, la falta de relación entre los grupos genéticos y el año, finca o provincia en que fueron obtenidos sugiere una

reintroducción del patógeno cada año con la semilla. Este resultado podría estar sesgado por un desbalance en el número de cepas de las distintas provincias; la mayoría correspondió a Buenos Aires por ser la zona de estudio de este trabajo, mientras que las cepas de otras provincias se incorporaron con fines comparativos. De manera similar, dentro del CVBALP una de las localidades, Colonia Urquiza, tiene más representantes en la colección que otras localidades. La simiente usada para la producción comercial de tomate en Argentina es, en su gran mayoría, importada (Argerich y Troilo, 2011). El ingreso de *Cmm* por esta vía ya fue demostrado por nuestro grupo de trabajo (Vega, 2015), y dos de las cepas incluidas en este estudio tuvieron ese origen. Por otra parte, los productores compran sus plantines a empresas especializadas en esa etapa de la producción. En el CVBALP existen varias plantineras que venden sus productos a otras provincias. Ésta podría ser la causa por la cual algunas cepas aisladas de plantas de un mismo híbrido, el mismo año y en provincias diferentes, pertenecieran al mismo grupo genético. Algo similar se observó en Estados Unidos y Canadá donde se pudo rastrear el origen del patógeno al estado de Georgia, desde donde se exportaban los plantines (Gitaitis *et al.*, 1991).

En este trabajo, en algunas ocasiones detectamos el mismo grupo genético en años sucesivos en el mismo lugar, lo cual sugiere la persistencia local del patógeno. En estudios previos, Kawaguchi y Tanina (2014) observaron que un 33 % de las plantas cultivadas en un sustrato infestado con rastrojo proveniente de plantas enfermas se infectaron. Por otra parte, en estudios realizados por nuestro grupo de trabajo en el CVBALP se demostró la supervivencia de este patógeno por casi nueve meses en rastrojos infestados en invernadero (Vega y Romero, 2016).

Un manejo incorrecto del cultivo puede determinar la existencia de varias fuentes de inóculo primario simultáneas. Así, mientras que todas las cepas aisladas en un mismo año y una misma finca tuvieron, en algunos casos, el mismo perfil genético, en otra finca en un solo muestreo se aislaron cepas de todos los grupos BOX-PCR y además, a partir de una misma planta aislamos dos cepas de grupos genéticos diferentes. Otros autores han informado resultados similares, Quesada-Ocampo *et al.* (2012) observaron la existencia de diferentes cepas en una misma planta muestreada en tres momentos diferentes del cultivo. Las cepas encontradas en el plantín trasplantado podrían tener orígenes distintos como pueden ser la semilla, rastrojos e infecciones secundarias que se originaron durante el manejo cultural del cultivo. Estos resultados sugieren que las poblaciones de *Cmm* presentes en el CVBALP pueden originarse a partir de distintas fuentes de inóculo primario, en algunos casos local, posiblemente en rastrojos infestados, y en otros de una fuente externa, posiblemente semillas infectadas/infestadas.

La detección de todos los productos de amplificación de los genes de patogenicidad estudiados en las cepas analizadas ponen en evidencia el alto grado de conservación de los mismos en la bacteria *Cmm*. Nuestros resultados coinciden con los de otros autores quienes analizaron este aspecto en cepas naturales aisladas de tomate, las cuales amplificaron los productos esperados para todos los genes de patogenicidad estudiados (Croce *et al.*, 2016); incluso cepas que no amplificaban varios de ellos fueron caracterizadas como pertenecientes a otra subespecie (Yim *et al.*, 2011). Sin embargo, discrepan con lo informado por otros autores quienes caracterizaron cepas

en las cuales no encontraron algunos de los genes. En esos casos la falta de dichos genes se relacionó con una disminución de la agresividad de las cepas (Kleitman *et al.*, 2008; Yasuhara-Bell *et al.*, 2013; Tancos *et al.*, 2015).

Las cepas analizadas difirieron en la localización de los genes de patogenicidad presentes en los plásmidos caracterizados de la cepa NCPPB382. En aquéllas que no evidenciaron la presencia del pCM1 pero sí del gen *celA*, este último podría encontrarse tanto en el cromosoma como en otro plásmido; incluso en un caso la secuencia *celA* se amplificó a partir del ADN genómico y no del ADN plasmídico, lo que sugiere que la secuencia se encontraría en el cromosoma. De manera similar, Kleitman *et al.* (2008) observaron cepas que no presentaron las bandas correspondientes al plásmido pCM1 pero amplificaron la secuencia de *celA*. Este gen se creía presente en todas las cepas silvestres patógenas (Kleitman *et al.*, 2008; Bella *et al.*, 2012). Sin embargo, recientemente en Nueva York y en Uruguay se demostró que 6 % y 2,5 % de cepas patógenas carecieron de este gen (Tancos *et al.*, 2015; Croce *et al.*, 2016). En consecuencia, el gen *celA* no sería imprescindible para la agresividad de la bacteria, contrariamente a lo que habían postulado Meletzus *et al.* (1993), quienes observaron que la reincorporación de este gen a cepas mutantes no agresivas y su posterior inoculación en plantas de tomate resultaba en el síntoma de marchitamiento típico de la enfermedad.

El gen *pat-1* también podría estar presente en otros plásmidos. Entre las cepas locales observamos un caso en que se detectó el gen *pat-1*, pero no el plásmido pCM2 que lo contiene. Resultados contrastantes se obtuvieron en otros estudios. Es así que en Israel, todas las cepas patógenas analizadas por Kleitman *et al.* (2008) tenían el gen *pat-1*, aunque en ninguna se detectó el plásmido pCM2. Por el contrario, en Italia, la falta de *pat-1* se atribuyó a la falta del plásmido pCM2 (Bella *et al.*, 2012). A pesar de ello, esas cepas lograron colonizar e infectar las plantas de tomate, por lo tanto, el gen *pat-1* tampoco sería indispensable para la inducción de la enfermedad y no debería ser utilizado para el diagnóstico, a diferencia de lo que se proponía en trabajos anteriores (Bella *et al.*, 2012).

La relación entre la presencia del plásmido pCM1 y el grupo BOX III da indicios de que dicho plásmido tiene una relación filogenética con la bacteria. Otros autores no pudieron establecer relación entre la presencia de los plásmidos y las agrupaciones obtenidas utilizando distintas técnicas de PCR (*i.e.* PFGE) o de secuenciación (*i.e.* MLST) (Kleitman *et al.*, 2008; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012). Por esta razón Kleitman *et al.* (2008) sugirieron que el cromosoma y los plásmidos evolucionaron independientemente. En su trabajo, las cepas locales tenían varios plásmidos diferentes y solo la cepa NCPPB382 presentaba el pCM1; por otra parte, esta cepa de referencia no agrupa con ninguna cepa israelí. Por lo tanto, el haplotipo representado por el grupo III de las cepas argentinas o por NCPPB382 no estaría presente en Israel. Los resultados aquí presentados muestran que la relación de este plásmido con un haplotipo podría ser una herramienta para describir la estructura poblacional de la bacteria e identificar la presencia de grupos dominantes.

La presencia de una única cepa del grupo BOX I que amplificó la secuencia del gen de replicación del pCM1 se puede relacionar con la transferencia lateral de información genética (Gartemann *et al.*, 2003; Chalupowicz *et al.*, 2010). Este tipo de

eventos también se corresponden con la transferencia de genes de patogenicidad y la resistencia a antibióticos (Gartemann *et al.*, 2003; Carattoli, 2011). La cepa con el plásmido pCM1 tuvo un perfil genético idéntico a las cepas del mismo grupo sin el plásmido. Esta información demuestra que el cebador BOX no amplifica ninguna secuencia del plásmido. Lo mismo se observó con la técnica PFGE (Milijašević-Marčić *et al.*, 2012). Si bien la presencia de pCM1 da indicio de pertenencia de una cepa al grupo BOX III, los grupos genéticos no indican la presencia de los plásmidos o de sus genes de patogenicidad y no estarían relacionados con la agresividad de las cepas.

Algunos autores establecieron una relación entre la agresividad de las cepas y los factores de patogenicidad presentes en la IP y los plásmidos; cepas sin alguno de los plásmidos o genes de la IP eran menos agresivas (Meletzus y Eichenlaub, 1991; Dreier *et al.*, 1997; Jahr *et al.*, 2000; Kleitman *et al.*, 2008; Tancos *et al.*, 2015). Por el contrario, en este trabajo la cepa de referencia NCPPB382 amplificó los productos esperados para todos los genes de patogenicidad estudiados, mientras que la NCPPB399 solo amplificó dos de ellos (*tomA* y *pat1*) y tuvieron una agresividad similar. Estas cepas de referencia tuvieron una agresividad similar (primavera 2014) o inferior (otoño 2016) a las locales. Esto coincide por lo observado por Bella *et al.* (2012) en Italia en relación con la cepa NCPPB382. En vista de estos resultados se puede inferir que la agresividad depende no solo de la presencia de los genes de patogenicidad, sino también de factores ambientales a los que cada cepa respondería de forma diferente.

En este trabajo encontramos que en las cepas locales los factores de patogenicidad estuvieron ampliamente distribuidos, a pesar de esto, su agresividad fue muy variable. Es posible que las diferencias en la agresividad se deban a discrepancias en la expresión de los factores de patogenicidad, a mutaciones en las secuencias, o a la presencia/ausencia de otros factores no considerados. Además, aún falta estudiar exhaustivamente si los factores ambientales pueden generar cambios en la expresión de la agresividad, como se pudo observar con las cepas de referencia. En otros trabajos se observó que temperaturas moderadas (18-24°C) en el momento de inoculación se relacionaron con una mayor expresión de los genes de patogenicidad de la cepa NCPPB382 y, en consecuencia, un menor tiempo de supervivencia de los plantines de tomate inoculados, que con temperaturas superiores o inferiores (Sharabani *et al.*, 2014).

La asociación entre los perfiles genéticos y la agresividad de las cepas puede ayudar a explicar la presencia de perfiles dominantes en una zona (Quesada-Ocampo *et al.*, 2012). En este trabajo los perfiles más representados incluyeron cepas muy agresivas y la cepa analizada del grupo menos representado resultó ser la menos agresiva; esto no necesariamente implica que las cepas del grupo III sean las menos agresivas, ya que el estudio se basa en una sola cepa, único representante identificado de ese grupo al momento de realizar los experimentos. De manera similar, en EE.UU. la proporción de cepas poco agresivas fue menor en el grupo más representado que en los menos representados (Louws *et al.*, 1998). La agresividad reducida de una cepa puede resultar en una menor capacidad competitiva y por lo tanto en una menor supervivencia. Este podría ser el caso de las cepas del grupo BOX III que se

encontraron en unos pocos invernaderos y, en el caso de uno que fue intensamente muestreado, en años muy distanciados entre sí. Por otra parte, en EE.UU. las cepas no patógenas representan una proporción importante (19 %) de las cepas aisladas en cultivo (Louws *et al.*, 1998). Las cepas de la colección previas a esta tesis se seleccionaron, entre otras características, por su patogenicidad en plantas de tomate, lo cual explicaría la ausencia de cepas no patógenas en nuestra colección.

Los resultados obtenidos en las inoculaciones en plantas variaron entre ensayos, pero en la mayoría de los casos se mantuvieron las tendencias observadas en la agresividad de cada cepa. En trabajos anteriores ya se informó que los primeros síntomas de la enfermedad se observan entre los 5 y 10 días después de inoculadas las plantas, independientemente de la cepa evaluada (Beimen *et al.*, 1992; Alvarez *et al.*, 2004), lo que coincide con lo observado en nuestros ensayos del 2014. En el ensayo realizado en otoño de 2016, todas las cepas tardaron más de 20 días en inducir síntomas en las plantas inoculadas, por lo que podrían ser caracterizadas como poco agresivas (Alvarez *et al.*, 2004). Estas variaciones posiblemente se debieron a variables ambientales; Chang *et al.* (1992b) y Sharabani *et al.* (2014) observaron que los cambios en la temperatura en distintas etapas del cultivo puede modular la agresividad de la enfermedad.

En resumen, las cepas presentes en el CVBALP y las provincias de Corrientes, Mendoza y Tucumán tuvieron una variabilidad genética moderada y similar a la observada en otros trabajos. Se observó la presencia de un haplotipo dominante, pero el mismo varió con la zona de producción. Comparando los perfiles genéticos obtenidos a lo largo de varios años y en distintos invernaderos inferimos que los diferentes haplotipos ingresan con las semillas o plantines y conviven con los que sobreviven en los rastrojos, incluso en una misma planta. Los genes de patogenicidad fueron muy conservados, pero no necesariamente los plásmidos conocidos. La agresividad de las cepas no se relacionó con ninguna de las características genéticas estudiadas, por lo que suponemos que puede haber otros factores intrínsecos y extrínsecos que modulan este factor.

E

Conclusiones

E. CONCLUSIONES

Situación actual del cancro y marchitamiento bacteriano del tomate y su agente causal *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

El tomate es uno de los cultivos hortícolas de mayor superficie y volumen de producción en Argentina y el mundo. El continuo crecimiento poblacional determina un aumento en la demanda de alimentos, que solo puede alcanzarse con un incremento en la superficie de cultivo o de los rendimientos actuales. Una gran limitante para lograr esto último son las enfermedades que atacan al cultivo. Entre ellas, el cancro y marchitamiento bacteriano es una de las enfermedades bacterianas más importantes del tomate. La muerte de plantas y la reducción del rendimiento provocan grandes pérdidas económicas para los productores, tanto en el área de este estudio como en otras zonas de Argentina y el mundo.

Para encontrar alternativas de manejo sustentables, como el desarrollo de cultivares de tomate resistentes, es fundamental conocer la diversidad genética y de agresividad de las poblaciones de *Cmm* presentes en las principales regiones productoras de tomate del país. En esta tesis se avanzó en este conocimiento, lo cual permitió hacer inferencias sobre el posible origen de las cepas y la importancia relativa de las dos principales fuentes de inóculo: las semillas importadas y los rastrojos infestados de cultivos anteriores. Por otra parte, se avanzó en el conocimiento de la presencia de determinantes genéticos de patogenicidad en poblaciones naturales de *Cmm* y se estableció su relación con la agresividad de las cepas.

En las dos secciones siguientes, y a la luz de los resultados obtenidos, se exponen, resumidamente, las hipótesis originalmente planteadas y se destacan los avances que esta tesis aportan al conocimiento del tema.

Hipótesis 1: Estructura y diversidad genética de las poblaciones de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Con esta tesis se conformó y analizó una colección de cepas *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* con aislamientos recolectados a lo largo de 14 años (2000-2013) en las principales provincias productoras de tomate del país: Buenos Aires, Corrientes, Mendoza y Tucumán. También se incluyó la cepa NCPPB382 utilizada como cepa de referencia en la mayor parte de los trabajos de caracterización genética de este patógeno, y la NCPPB399, cepa referenciada como de baja agresividad. Utilizando la técnica BOX-PCR se describió por primera vez la diversidad genética de cepas de *Cmm* presentes en Argentina. Las cepas locales se agruparon en tres grupos con una alta similitud, lo cual nos llevó a concluir que, en el país, la diversidad genética de las cepas es moderada. Esta moderada variabilidad podría ser el resultado del ingreso de semillas infectadas/infestadas provistas por un número limitado de empresas importadoras. Al igual que se observó en otros países, uno de los grupos de BOX-PCR agrupó al mayor número de cepas y también a las más agresivas, lo cual podría explicar su predominancia. La agresividad de un patógeno se considera una componente importante de la aptitud (*fitness*) de cada genotipo (Andrison, 1993).

Los estudios de la estructura y diversidad genética de las poblaciones de un patógeno resultan de utilidad para inferir cuál es o cuáles son las principales fuentes de inóculo primario, y por tanto la importancia relativa de su ingreso desde otras áreas vs la persistencia local, lo cual se convierte en una información clave para encarar su control. El análisis de la diversidad genética de *Cmm*, en diferentes fincas del CVBALP y diferentes años, aportó evidencias de que coexisten cepas de origen local, posiblemente sobreviviendo en rastrojos, con otras que estarían ingresando con los plantines producidos a partir de semillas importadas. La presencia de los mismos grupos genéticos en el CVBALP, Corrientes, Mendoza y Tucumán sugiere un origen común. Como ya fue observado por Gitaitis *et al.* (1991) en EE.UU. y Canadá, la exportación de plantines desde una región productora hacia otras zonas podría explicar este resultado.

En resumen, los resultados obtenidos permiten aceptar la primera hipótesis propuesta en el trabajo: La estructura poblacional y la diversidad genética de *Cmm* están determinadas por el origen de las cepas, ya sea a través de su introducción en semillas importadas infectadas/infestadas o su persistencia local.

Hipótesis 2: Genes de patogenicidad presentes en los plásmidos y la IP del cromosoma y su relación con la agresividad

La mayor parte de los estudios anteriores sobre determinantes genéticos de patogenicidad de *Cmm* se realizaron con la cepa NCPPB382. En los últimos años también se comenzaron a estudiar otras cepas procedentes de distintas zonas donde el tomate representa uno de los principales cultivos. En los casos analizados en esos estudios previos, la agresividad de las cepas estuvo relacionada con los genes de patogenicidad presentes en los plásmidos o en la IP del cromosoma descriptos en la cepa NCPPB382.

En este trabajo no fue posible establecer esa relación utilizando las cepas locales. A pesar de que los genes de patogenicidad estuvieron presentes en todas las cepas, hubo diferencias significativas en la agresividad entre cepas, incluso dentro de un mismo grupo de BOX-PCR. Un resultado diferente se observó con las cepas de referencia NCPPB382 y NCPPB399, las cuales mostraron la misma agresividad, a pesar de que una de ellas solo mostró amplificación para algunos de los genes de patogenicidad (*tomA* y *pat-1*, cepa NCPPB399). Parece que la agresividad de estas cepas no depende únicamente de la presencia de los genes de patogenicidad, probablemente también esté relacionada a la expresión de los mismos, a la presencia de otros genes que regulen los factores de patogenicidad y a variables ambientales.

El plásmido pCM1, descripto en NCPPB382, estaría relacionado con la filogenia de la bacteria, ya que su presencia se relacionó con uno de los grupos de BOX-PCR, por lo tanto su presencia podría dar indicio de la presencia de este grupo. La mayoría de las cepas analizadas no amplificaron para la secuencia de replicación del plásmido pCM1. Sin embargo, el gen de la endo- β -1,4-glucanasa *celA* está presente en todas las cepas analizadas, lo que sugiere que puede localizarse en otros plásmidos o en el cromosoma.

Estos hallazgos nos llevan a rechazar la segunda hipótesis. Por lo tanto, la agresividad de las cepas de *Cmm* no está determinada únicamente por los plásmidos portadores de genes de patogenicidad y por el tipo de esos genes presentes en la isla de patogenicidad. La ausencia de alguno de los plásmidos no determina una menor agresividad de las cepas de *Cmm*.

Relevancia de la investigación

Se determinó que las poblaciones locales de *Cmm* están conformadas por tres grupos genéticos, uno de los cuales es dominante e incluye algunas de las cepas más agresivas. Esta información es relevante al elegir cepas representativas para realizar estudios de manejo y de mejoramiento genético de resistencia a la enfermedad en tomate.

En las principales zonas productoras del país se encontraron cepas pertenecientes a los mismos grupos de BOX-PCR, lo que se explicaría por la comercialización de plantines producidos en una zona hacia otras regiones del país o la adquisición de semillas importadas del mismo origen por productores de distintas provincias. Sin embargo, los grupos dominantes en cada zona fueron diferentes, lo que podría tener relación con el origen de la semilla o con la adaptación de los distintos genotipos del patógeno a los ambientes particulares de cada región. Sería conveniente realizar un relevamiento sistematizado de la enfermedad en los invernaderos de cada zona de producción para corroborar esa dominancia diferencial de los grupos según zonas. Esta información conduciría a un manejo integrado del patógeno a nivel local.

Conocer la importancia relativa de las fuentes de inóculo primario en una zona de producción permite orientar las estrategias de manejo preventivos de la enfermedad. Los perfiles genéticos de los aislamientos analizados en este estudio sugieren que algunas cepas sobreviven localmente mientras otras ingresan cada año, probablemente en las semillas que se importan para cada ciclo de producción. Este conocimiento fundamenta la necesidad de un cuidadoso saneamiento de los invernaderos entre cultivos y de la implementación de rotaciones de cultivos. Sin embargo, la alta especialización de la producción dificulta esta última medida de manejo. Las prácticas que tienden a eliminar el inóculo inicial a nivel local no pueden ser efectivas si no se controla la sanidad de las semillas o, en su defecto, se las trata térmica o químicamente para reducir la probabilidad de ingreso del patógeno por esta vía.

Las cepas locales presentan una gran variabilidad en su agresividad, pese a que en todas se detectaron los mismos genes de patogenicidad. Este resultado sugiere que la presencia de los factores genéticos de patogenicidad descriptos en la cepa NCPB382 no serían los únicos determinantes de la agresividad de las cepas de *Cmm*. Se debería continuar investigando cuál es el papel de estos genes en el desarrollo de la enfermedad, así como la presencia de otros factores de patogenicidad en el genoma de las cepas. Esta información también reviste importancia para la selección de variedades de tomate resistentes al cancro y marchitamiento bacteriano del tomate.

El pCM1 mostró estar asociado a un grupo particular de BOX-PCR, lo cual sugiere una relación filogenética entre el plásmido y la bacteria *Cmm*. A pesar de que la

presencia o no de este factor no es de importancia directa para la agresividad de las cepas, puede ser una herramienta de diferenciación entre haplotipos, y por lo tanto, contribuir a la caracterización de los grupos dominantes en cada zona de producción.

Actualmente se continúa con el estudio de las mejores condiciones para la aplicación de las buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate (Argerich y Troilo, 2011). El cancro y marchitamiento bacteriano es considerada una de las principales enfermedades bacterianas de este cultivo, y su principal enfermedad vascular. La importancia de los resultados aquí presentados reside en el aporte de los conocimientos necesarios para generar prácticas de manejo más confiables, efectivas y sustentables para la producción de esta hortaliza.

A modo de corolario se propone un modelo conceptual del ingreso y persistencia de la bacteria en los invernaderos y de los diferentes factores que modulan la agresividad de las cepas.

Las cepas de *Cmm* ingresan al país en las semillas infestadas/infectadas, importadas de otros países. La moderada diversidad genética del patógeno sugiere que serían pocos los proveedores de semillas, o al menos los lugares de procedencia de esas semillas importadas. En líneas generales, las semillas son utilizadas por las plantineras y podrían ser fuente de inóculo de uno o varios haplotipos de *Cmm*. Asimismo, algunas prácticas de manejo habituales en la producción de plantines, como el riego y la utilización de herramientas o instalaciones infestadas, o más recientemente los injertos, pueden ser una posible fuente de contaminación. El comercio de plantines entre diferentes zonas del país permite la dispersión del patógeno entre regiones productoras.

En un plantín asintomático puede haber uno o más haplotipos de la bacteria *Cmm*, los cuales ingresarían así al invernadero. Cuantos más haplotipos estén presentes en un invernadero, mayor sería la dificultad para el manejo de la enfermedad, ya que las cepas dominantes en este trabajo también incluían a las más agresivas. Así, el ingreso de una cepa de mayor agresividad podría resultar en una mayor incidencia y dificultad de erradicación del cancro y marchitamiento bacteriano del tomate en los invernaderos.

Los rastros que permanecen en el suelo del invernadero entre un cultivo y el siguiente también representan una fuente de inóculo primaria importante. Esto determina que haplotipos existentes previamente en los invernaderos convivan con otros que ingresan con los plantines adquiridos recientemente, lo cual tornaría más difícil el manejo de la enfermedad. Las prácticas de manejo utilizadas hasta el momento son poco efectivas o de costos muy altos. Esto hace que muchos productores prefieran eliminar rápidamente las plantas sintomáticas, e incluso en algunos casos también las plantas asintomáticas aledañas.

Continuación de la investigación

El trabajo desarrollado en esta tesis permitió avanzar en el conocimiento de la relación entre la presencia de los genes de patogenicidad conocidos en *Cmm* y su

agresividad, así como estudiar por primera vez a nivel local la diversidad genética del patógeno y relacionarla con la/s posible/s fuente/s de inóculo primario.

Para tener un mejor conocimiento del origen de las poblaciones de *Cmm* presentes en Argentina, sería conveniente ampliar la colección de cepas incorporando más representantes de otras zonas de producción de tomate y, también, comparar las cepas locales con las de otros países. Para hacer esta comparación se pueden secuenciar los genes de mantenimiento de la vida celular, conocidos como *housekeeping*, y otros genes cuya función está relacionada con la patogenicidad de las cepas. Algunos de estos genes ya han sido secuenciados por otros grupos de investigación en cepas de *Cmm* de otros países. Se podrían así comparar los perfiles generados y determinar la distancia genética entre las cepas utilizando la técnica conocida como Tipificación de secuencia de locus múltiples (MLST, por sus siglas en inglés).

Por otra parte, a partir de este trabajo sabemos que la variabilidad en la agresividad de las cepas resultó muy alta, aún entre cepas que cuentan con los mismos genes de patogenicidad. Desconocemos si existen diferencias en la secuencia o en el nivel de expresión de esos genes en las poblaciones naturales de *Cmm*. La secuenciación de genes de agresividad conservados ya identificados y la comparación de la expresión de estos genes en cepas con diferente agresividad permitirá establecer su contribución a la misma. La realización de los ensayos de agresividad en condiciones más controladas, como en cámaras de crecimiento, permitirían reducir la variabilidad no controlada en la expresión de los síntomas.

Asimismo, la capacidad enzimática, como por ejemplo la celulolítica y proteolítica, de cepas naturales de *Cmm* son poco conocidas y podrían estar relacionadas con las diferencias de agresividad entre las cepas. Por otra parte, las variaciones observadas en la agresividad para una misma cepa en diferentes ensayos podrían tener relación con el efecto de condiciones ambientales, como la temperatura sobre la actividad enzimática. Utilizando cámaras de cultivo se podría estudiar la variación de la agresividad de cepas naturales en diferentes condiciones ambientales. La actividad de las enzimas y su posible modulación por la temperatura puede determinarse en estudios *in vitro*.

F

Referencias

F. REFERENCIAS

- Alvarez, A.M., W.S. Kaneshiro, y B.G. Vine. 2004. Diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in tomato seed: What is the significance? ISHS Acta Hort 695: 205–214.
- Andrivon, D. 1993. Nomenclature for Pathogenicity and Virulence: The Need for Precision. *Phytopathology* 83(9): 889–890.
- Argerich, C., y L. Troilo. 2011. Manual de buenas prácticas agrícolas en la cadena de tomate (C Argerich y L Troilo, Eds.). FAO, CABA, Argentina. 258 pp.
- Baysal, Ö., F. Mercati, H. İkten, R.Ç. Yıldız, F. Carimi, Y. Aysan, J. a. Teixeira da Silva, H. İkten, R. Çetinkaya, F. Carimi, J.A. Teixeira, H. İkten, R.Ç. Yıldız, Y. Aysan, y J. a. Teixeira da Silva. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiol Mol Plant Pathol* 75(3): 113–119.
- Beimen, A., A. Bermpohl, D. Meletzus, R. Eichenlaub, y W. Barz. 1992. Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* strains Differing in Virulence. *Z Naturforsch* 47(c): 898–909.
- Bella, P., G. Ialacci, G. Licciardello, R. La Rosa, y V. Catara. 2012. Characterization of atypical *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in greenhouse tomatoes in Italy. *J Plant Pathol* 94(3): 635–642.
- Bermpohl, A., J. Dreier, R. Bahro, y R. Eichenlaub. 1996. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol Res* 151(4): 391–399.
- Borboa Flores, J., E.O. Rueda Puente, E. Acedo Félix, J.F. Ponce, M. Cruz, O. Grimaldo Juárez, y A.M. García Ortega. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, Mexico. *Rev Fitotec Mex* 32(4): 319–326.
- Burger, A., I. Gräfen, J. Engemann, E. Niermann, M. Pieper, O. Kirchner, K.-H. Gartemann, y R. Eichenlaub. 2005. Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol Res* 160(4): 417–427.
- Carattoli, A. 2011. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol* 301(8): 654–658.
- Chaldecott, M. a., y T.F. Preece. 1983. The use of a tomato cotyledon test to identify *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. *Plant Pathol* 32(4): 441–448.
- Chalupowicz, L., M. Cohen-Kandli, O. Dror, R. Eichenlaub, K.-H.K.H. Gartemann, G. Sessa, I. Barash, y S. Manulis-Sasson. 2010. Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 100(3): 252–261.

- Chalupowicz, L., E. Zellermann, M. Fluegel, O. Dror, R. Eichenlaub, K.H. Gartemann, A. Savidor, G. Sessa, N. Iraki, I. Barash, y S. Manulis-Sasson. 2012. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* 102(1): 23–31.
- Chang, R., S. Ries, y J. Patakay. 1992a. Reductions in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial canker. *Plant Dis* 78(8): 805–809.
- Chang, R., S. Ries, y J. Patakay. 1992b. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Dis* 76(11): 1150–1155.
- Corvo Dolcet, S. 2005. Zonas de producción del cultivo del tomate en la Argentina. *Secr Agric Ganad Pesca y Aliment*: 1–15 Disponible en www.seedquest.com/News/releases/2005/pdf/13528.pdf. (recuperado el 17 febrero 2016).
- Croce, V., M.J. Pianzola, K. Durand, M. González-Arcos, M.-A. Jacques, y M.I. Siri. 2016. Multilocus Sequence Typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay. *Eur J Plant Pathol* 144(1): 1–13.
- Dal Bó, E., N. Cardozo, P. Lopez Lambertini, C. Samaniego, y M. Colombo. 2014. Enfermedades de *Solanum lycopersicum* L. (tomate). *Atlas Fitopatológico Argentino*. 4(4). Recuperado de: <http://rian.inta.gov.ar/atlas/Inicio.aspx#/ConsultaGeneral?Id=718> (recuperado el 17 febrero 2016).
- De Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58(7): 2180–2187.
- de León, L., A. Rodríguez, P. Llop, M.M. López, y F. Siverio. 2009. Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. *Plant Pathol* 58(5): 862–871.
- de León, L., F. Siverio, M.M. López, y A. Rodríguez. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborn tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Dis* 95(11): 1328–1339.
- Dreier, J., D. Meletzus, y R. Eichenlaub. 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol Plant Microbe Interact* 10(2): 195–206.
- Dullahide, S., M. Moffett, J. Heaton, y J. Giles. 1983. Effect of time of inoculation of *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* on yield of trellised tomatoes. *Australas Plant Pathol* 12(2): 15.
- Eichenlaub, R., y K. Gartemann. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of Gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 49: 445–64.

- Eichenlaub, R., K.-H. Gartemann, y A. Burger. 2006. *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. p. 385–421. En Gnanamanickam, S.S. (ed.), Plant-Associated Bacteria. Springer Netherlands, Dordrecht.
- EPPO. 2015. Database on quarantine pests. Disponible en <http://www.eppo.int/> (recuperado el 17 febrero 2016).
- Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47–50.
- FAO. 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en www.fao.org. (recuperado el 1 de marzo de 2017).
- Fernandez Valiela, M.V. (INTA). 1975. Introducción a la Fitopatología. Vol. II: Bacterias, fisiogénicas, fungicidas, nematodos. Colección Científica INTA 3a Edición Buenos Aires República Argentina: 821.
- Gartemann, K.H., B. Abt, T. Bekel, A. Burger, J. Engemann, M. Flügel, L. Gaigalat, A. Goesmann, I. Gräfen, J. Kalinowski, O. Kaup, O. Kirchner, L. Krause, B. Linke, A. McHardy, F. Meyer, S. Pohle, C. Rückert, S. Schneiker, E.-M. Zellermann, A. Pühler, R. Eichenlaub, O. Kaiser, y D. Bartels. 2008. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol* 190(6): 2138–2149.
- Gartemann, K.H., O. Kirchner, J. Engemann, I. Gräfen, R. Eichenlaub, y A. Burger. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J Biotechnol* 106(2–3): 179–191.
- Gitaitis, R.D., R.W. Beaver, y A.E. Voloudakis. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Dis* 75(8): 834–838.
- Gleason, M.L., R.D. Gitaitis, y M.D. Ricker. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Dis* 77(11): 1069–1076.
- González, A.J., y E. Trapiello. 2014. *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* subsp. nov., pathogenic in bean. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(5): 1752–1755.
- Hadas, R., G. Kritzman, F. Kletman, T. Gefen, y S. Manulis. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathol* 54: 643–649.
- Ialacci, G.M., P. Bella, G. Licciardello, C. Strano, R. Eichenlaub, K.H. Gartemann, R. La Rosa, y V. Catara. 2015. Clonal populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* are responsible for the outbreaks of bacterial canker in greenhouse tomatoes in Italy. *Plant Pathol*: 1–12.

- Jacobs, J.L., T.L. Carroll, y G.W. Sundin. 2005. The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microb Ecol* 49(1): 104–113.
- Jacques, M.-A., K. Durand, G. Orgeur, S. Balidas, C. Fricot, S. Bonneau, A. Quillévére, C. Audusseau, V. Olivier, V. Grimault, R. Mathis, y A. Quillevere. 2012. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl Environ Microbiol* 78(23): 8388–8402.
- Jagger, M., y K. Richards. 2008. Temporal analysis I: quantifying and comparing epidemics. p. 63–116. *En* Madden, L. V, Hughes, G., Van den Bosch, F. (eds.), *The Study of Plant Disease Epidemics*. 2^a ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnessota, EE.UU.
- Jahr, H., R. Bahro, A. Burger, J. Ahlemeyer, y R. Eichenlaub. 1999. Minireview Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Enviromental Microbiol* 1(2): 113–118.
- Jahr, H., J. Dreier, D. Meletzus, R. Bahro, y R. Eichenlaub. 2000. The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 13(7): 703–714.
- Janse, J.D. 2005. Prevention and control of bacterial pathogens and diseases. p. 149–174. *En* Janse, J.D. (ed.), *Phytopathology : Principles and Practice*. CABI, Wallingford.
- Kaneshiro, W.S. 2003. Detection and characterization of virulent, hypovirulent, and nonvirulent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Thesis. Botanical Science department. University of Hawaii. Manoa.
- Kaufmann, M.E. 1998. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. p. 33–50. *En* *Molecular Bacteriology*. Humana Press, New Jersey.
- Kawaguchi, A., y K. Tanina. 2014. Genetic groups of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* identified by DNA fingerprinting and the effects of inoculation methods on disease development. *Eur J Plant Pathol* 140: 399–406.
- Kawaguchi, A., K. Tanina, y K. Inoue. 2010. Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathol* 59(1): 76–83.
- Kleitman, F., I. Barash, A. Burger, N. Iraki, Y. Falah, G. Sessa, D. Weinthal, L. Chalupowicz, K.H. Gartemann, R. Eichenlaub, y S. Manulis-Sasson. 2008. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* population in Israel. *Eur J Plant Pathol* 121(4): 463–475.
- Lewis Ivey, M.L., y S.A. Miller. 2000. First report of bacterial canker of pepper in Ohio. *Plant Dis* 84(7): 810–810.
- Lindstedt, B. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for

- genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26(13): 2567–82.
- Louws, F.J., J. Bell, C.M. Medina-Mora, C.D. Smart, D. Opgenorth, C.A. Ishimaru, M.K. Hausbeck, F.J. de Bruijn, y D.W. Fulbright. 1998. rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* 88(8): 862–868.
- Louws, F., M. Schneider, y F. De Bruijn. 1997. Assessing genetic diversity of microbes using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). p. 63–94. *En* Toranzos, G. (ed.), *Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Enviromental Samples*.
- Maiden, M.C.J. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 561–588.
- Medina-Mora, C., M. Hausbeck, y F. DW. 2001. Bird' s eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis* 85: 88–91.
- Meletzus, D., A. Bermphol, J. Dreier, y R. Eichenlaub. 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J Bacteriol* 175(7): 2131–2136.
- Meletzus, D., y R. Eichenlaub. 1991. Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by electroporation and development of a cloning vector. *J Bacteriol* 173(1): 184–190.
- Micheli, M.R., R. Bova, E. Pascale, y E. D'Ambrosio. 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res* 22(10): 1921–1922.
- Milijašević-Marčić, S., K.H. Gartemann, J. Frohwitter, R. Eichenlaub, B. Todorović, E. Rekanović, y I. Potočnik. 2012. Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. *Eur J Plant Pathol* 134(4): 697–711.
- Mueller, U., y L. Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 14(10): 389–394.
- Nakama, M., y J. Fernández Lozano. 2006. Boletín electrónico de tomate. Inst Nac Tecnol Agrpecuaria: 10 Dipunible en <http://www.mercadocentral.gob.ar/boletin/pdf/Tomate1.pdf> (recuperado el 7 agosto 2016).
- Nazari, F., G.R. Niknam, A. Ghasemi, S.M. Taghavi, H. Momeni, y S. Torabi. 2007. An investigation on strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in north and north west of Iran. *J Phytopathol* 155(9): 563–569.
- OEPP/EPPO. 2013. PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. OEPP/EPPO Bull 43(1): 46–67.
- Oh, E., C. Bae, H. Lee, I.S. Hwang, H. Lee, M.C. Yea, K. Yim, S. Lee, S. Heu, J. Cha, y C. Oh. 2016. *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov., causing bacterial canker disease in pepper. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(10):

4065–4070.

- Pastor, N., E. Carlier, J. Andrés, S.B. Rosas, y M. Rovera. 2012. Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. *J Environ Manage* 95(SUPPL.): S332–S337.
- Pastrik, K.H., y F.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J Phytopathol* 147: 687–693.
- Pollack, L.A. 2012. La trama del conocimiento. Toda la tecnología del tomate en Argentina. Instituto Nac Tecnol Agropecu: 1 Disponible en <http://inta.gob.ar/noticias/la-trama-del-conocimiento.-toda-la-tecnologia-del-tomate-en-argentina> (recuperado el 27 febrero 2013).
- Poysa, V. 1993. Evaluation of tomato breeding lines resistant to bacterial canker. *Can J Plant Pathol* 15: 301–304.
- Quesada-Ocampo, L., N.A. Landers, A.C. Lebeis, D.W. Fulbright, y M.K. Hausbeck. 2012. Genetic structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in Michigan commercial tomato fields. *Plant Dis* 96(6): 788–796.
- R Core Team. 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Disponible en <http://www.r-project.org/>. (recuperado el 1 de marzo de 2017)
- Reddy, M.P., N. Sarla, y E.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9–17.
- Rolleri, J. 2015. Cancro bacteriano del tomate: diagnóstico y prevención de su dispersión en el cultivo (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Recuperada de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/57635/Documento_completo.%202015.pdf-PDFA.pdf?sequence=3. (recuperado el 1 de marzo de 2017)
- Saperstein, S., M.P. Starr, y J. a Filfus. 1954. Alterations in carotenoid synthesis accompanying mutation in *Corynebacterium michiganense*. *J Gen Microbiol* 10(1): 85–92.
- Sen, Y., Z. Feng, H. Vandenbroucke, J. Wolf, R.G.F. Visser, y a. W. Heusden. 2012. Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica* 190(2): 309–317.
- Sen, Y., J. van der Wolf, R.G.F. Visser, y S. van Heusden. 2015. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Dis* 99(1): 4–13.
- Sharabani, G., S. Manulis-Sasson, M. Borenstein, R. Shulhani, M. Lofthouse, L. Chalupowicz, y D. Shtienberg. 2013. The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathol* 62(3): 578–586.
- Sharabani, G., S. Manulis-Sasson, L. Chalupowicz, M. Borenstein, R. Shulhani, M. Lofthouse, M. Sofer, O. Frenkel, O. Dror, y D. Shtienberg. 2014. Temperature at the early stages of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection

- affects bacterial canker development and virulence gene expression. *Plant Pathol* 63(5): 1119–1129.
- Strider, D.L. 1970. Tomato seedling inoculations with *Corynebacterium michiganense*. *Plant Dis Report* 54(1): 36–39.
- Tancos, M.A., L. Chalupowicz, I. Barash, S. Manulis-Sasson, y C.D. Smart. 2013. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Appl Environ Microbiol* 79(22): 6948–6957.
- Tancos, M.A., H.W. Lange, y C.D. Smart. 2015. Characterizing the genetic diversity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in New York. *Phytopathology* 105(2): 169–179.
- Vega, D. 2015. Rol epidemiológico de restos culturales y semillas en el desarrollo del cancro bacteriano del tomate en invernaderos del cinturón verde Buenos Aires – La Plata (Tesis de Maestría). Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Vega, D., y A.M. Romero. 2016. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato debris under greenhouse conditions. *Plant Pathol* 65(4): 545–550.
- Versalovic, J. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 5(1): 25–40.
- Werner, N.A., D.W. Fulbright, R. Podolsky, J. Bell, y M.K. Hausbeck. 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Dis* 86: 535–542.
- Xu, X., S.A. Miller, F. Baysal-Gurel, K.-H. Gartemann, R. Eichenlaub, y G. Rajashekara. 2010. Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Appl Environ Microbiol* 76: 3978–3988.
- Yasuhara-Bell, J., y A.M. Alvarez. 2015. Seed-associated subspecies of the genus *Clavibacter* are clearly distinguishable from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 65(3): 811–826.
- Yasuhara-Bell, J., R. Kubota, D.M. Jenkins, y A.M. Alvarez. 2013. Loop-mediated amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *micA* gene is highly specific. *Phytopathology* 103(12): 1220–1226.
- Yim, K.-O., H.-I. Lee, J.-H. Kim, S.-D. Lee, J.-H. Cho, y J.-S. Cha. 2011. Characterization of phenotypic variants of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolated from *Capsicum annuum*. *Eur J Plant Pathol* 133(3): 559–575.
- Zaluga, J., J. Van Vaerenbergh, P. Stragier, M. Maes, P. De Vos, J. Van Vaerenbergh, y P. De Vos. 2013. Genetic diversity of non-pathogenic *Clavibacter* strains isolated from tomato seeds. *Syst Appl Microbiol* 36(6): 426–435.

